



Mafalda Barroso Capela Dias Pinto

Licenciada em Biologia

**Desenvolvimento de bionanoconjugados para a
deteção de anticorpos anti-*Pneumocystis*
*jirovecii***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Ricardo Franco, Professor Auxiliar, FCT/UNL
Coorientadora: Doutora Olga Matos, Professora com agregação, IHMT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Inv. Doutora Maria Manuela Jesus Guilherme Gaspar

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2016



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Mafalda Barroso Capela Dias Pinto
Licenciada em Biologia

**Desenvolvimento de bionanoconjugados para a deteção de anticorpos anti-
*Pneumocystis jirovecii***

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientador:

Doutor Ricardo Franco, Professor Auxiliar, FCT/UNL

Coorientadora:

Doutora Olga Matos, Professora com agregação, IHMT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Inv. Doutora Maria Manuela Jesus Guilherme Gaspar

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

**Setembro
2016**

Desenvolvimento de bionanoconjugados para a deteção de anticorpos anti-*Pneumocystis jirovecii*

Copyright Mafalda Barroso Capela Dias Pinto, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ricardo Franco, agradeço pelo apoio constante e desafios colocados, sem dúvida essenciais para o cumprimento desta tese e para o meu desenvolvimento académico. Agradeço por me ter acolhido no seu laboratório e por toda a orientação.

À Professora Doutora Olga Matos, agradeço por toda a amabilidade e por me ter dado a possibilidade de realização deste projeto, assim como a sua constante preocupação e disponibilidade para o sucesso do mesmo.

À Doutora Inês Gomes, agradeço por todos os ensinamentos, apoio, palavras carinhosas e confiança depositada em mim.

Ao Investigador Fernando Cardoso, agradeço a confiança, a disponibilidade inegável e apoio científico prestados.

Ao pessoal dos laboratórios: “Santa” Maria João Oliveira, Marta “Fixe” Giza, Ana Tomás Chocalheiro, Cátia Mota e Jorge Figueiredo agradeço pela companhia, gargalhadas e suporte dado sempre que necessário. Não serão esquecidos!

À minha família do mundo académico: “Dódio” Pinheiro, “Anicas” Matias, “Sarocas” Correia, “Sónica” Correia, “Aleksa” Azevedo, “Zapiqui” Zapico, “Johnny” Martins e “Prati” Prata agradeço a força, as palhaçadas, o encorajamento, os inúmeros e tão necessários almoços e jantares ao longo desta etapa e dos anos. Parabéns a nós todos!

Aos gordos de longa data: João Vaz, João Rodrigues, Fábio Anastácio e Filipa Valente, não tenho palavras para descrever o que significam há mais de uma década. Aos nossos cafés incontáveis e apoio durante este momento da minha vida.

Aos meus pais e irmão, porque foram vocês que possibilitaram mais uma etapa da minha vida académica, pelo vosso apoio, pela mega paciência para aturar os meus maus humores tardios e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Obrigado por tudo!

Ao meu “Mon”. Pelo apoio e amor incondicional ao longo de 7 anos, por me fazeres ver sempre o lado positivo, por nunca me deixares desamparada e me teres ensinado a relaxar. Obrigado Dário!

“Anybody who has been seriously engaged in scientific work of any kind realizes that over the entrance to the gates of the temple of science are written the words: ‘Ye must have faith.’”
- Max Planck

RESUMO

A Pneumocistose é uma doença infecciosa causada por *Pneumocystis jirovecii*, um fungo atípico que apresenta tropismo para os pulmões. É uma doença que afeta grande parte da população mundial, surgindo principalmente em doentes imunodeprimidos, sendo o diagnóstico precoce essencial para uma atuação eficaz contra o desenvolvimento da doença. A produção de antígenos sintéticos associados a métodos de detecção robustos, sensíveis e baratos permitem o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido (TDR) que possibilitam a utilização de espécimes biológicos de fácil obtenção.

A presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de bionanoconjugados robustos, constituídos por nanopartículas de ouro (AuNP) conjugadas com um antígeno sintético recombinante multiepítipo (ar_{sm}) específico, que permitirão a criação de um TDR imunocromatográfico em fluxo lateral para a detecção de anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii* no soro de doentes. O antígeno r_{sm} foi obtido através de um sistema de sobreexpressão recombinante em *Escherichia coli* XJb(DE3) e purificado por cromatografia de afinidade com íons cobre imobilizados.

As AuNP foram sintetizadas seguindo o método de redução de sal de Au(III) com citrato de sódio em meio aquoso, levando à formação de uma solução coloidal de AuNP. Os bionanoconjugados foram caracterizados através de espectroscopia de UV-Vis e eletroforese em gel de agarose a 0,3%, permitindo provar a sua formação e determinar a quantidade de antígeno r_{sm} necessária para revestir a superfície das AuNP. Através destes métodos de caracterização, obtiveram-se bionanoconjugados estáveis compostos por AuNP-MUA-BSA-Antígeno, para uma razão molar [BSA-Antígeno]/[AuNP-MUA] de 300 e de [BSA]/[Antígeno] de 0,75, sendo a BSA o agente estabilizante da ligação AuNP-antígeno r_{sm}. Ainda confirmou-se a ligação dos bionanoconjugados a soro policlonal contendo anticorpos anti-antígeno r_{sm}, observando-se para a razão molar [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] de 0,3, a interação específica entre ambos e comprovando-se a possibilidade de utilização dos bionanoconjugados no desenvolvimento do TDR para a pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (PPc).

Palavras-chave: Pneumocistose; *Pneumocystis jirovecii*; Nanopartículas de Ouro; Antígeno recombinante sintético multiepítipo; Bionanoconjugados

ABSTRACT

Pneumocystis pneumonia (PcP) is an infectious disease caused by *Pneumocystis jirovecii*, an atypical fungus that exhibits tropism for the lungs. PcP is a disease that affects much of the world population, mainly affecting immunosuppressed patients, being the early diagnosis essential for effectively fight the development of this disease. The production of synthetic antigens associated with robust, sensitive and cheap detection methods allows the development of rapid diagnostic tests (RDT), which allow the use of biological specimens obtained in a less invasive manner.

The present dissertation was aimed at the development of robust bionanoconjugates composed by gold nanoparticles (AuNP) conjugated with a specific synthetic multiepitope recombinant (smr) antigen, which will allow the creation of an immunochromatographic RDT in lateral flow for the detection of circulating antibodies to *P. jirovecii* in patients serum. The smr antigen was obtained through overexpression of a recombinant system in *Escherichia coli* XJb(DE3) and purified with immobilized copper ion-affinity chromatography.

Gold nanoparticles (AuNP) were synthesized following the reduction of Au(III) salt with sodium citrate method in aqueous medium, forming a colloidal solution of AuNP. Bionanoconjugates were characterized through UV-Vis spectroscopy and agarose gel electrophoresis at 0,3%, confirming the formation of bionanoconjugates and allowing the determination of the amount of smr antigen necessary to fully coat the surface of AuNP. Through this characterization methods, it was possible to obtain stable AuNP-MUA-BSA-Antigen bionanoconjugates, for a molar ratio [BSA-Antigen]/[AuNP-MUA] of 300 and [BSA]/[Antigen] of 0,75, being BSA the stabilizing agent between AuNP-smr antigen. The binding between bionanoconjugates and polyclonal serum with antibodies to smr antigen was confirmed for the molar ratio [Serum]/[AuNP-MUA-BSA-Antigen] of 0,3, providing a specific interaction and confirming the possible utilization of these bionanoconjugates in the development of an RDT for *Pneumocystis pneumonia* (PcP).

Key words: *Pneumocystis pneumonia*; *Pneumocystis jirovecii*; Gold nanoparticles; Synthetic recombinant multiepitope antigen; Bionanoconjugates

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE CONTEÚDOS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Pneumocistose	1
1.1.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i>	1
1.1.2 Morfologia e ciclo de vida	2
1.1.3 Transmissão de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	3
1.1.4 Diagnóstico da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	4
1.1.4.1 Diagnóstico diferencial.....	4
1.1.4.2 Diagnóstico definitivo	5
1.1.4.2.1 Métodos de coloração histoquímica	5
1.1.4.2.2 Imunofluorescência com anticorpos monoclonais.....	6
1.1.4.2.3 Detecção molecular por PCR.....	6
1.1.5 Tratamento de PPC.....	7
1.2 Glicoproteínas Major de Superfície (Msg)	7
1.2.1 Antígeno recombinante sintético multiépítopo	8
1.3 Proteínas recombinantes His-Tag e purificação por IMAC	8
1.4 Nanopartículas de ouro: Propriedades e aplicações.....	10
1.4.1 Funcionalização de nanopartículas de ouro.....	12
1.4.2 EDC/NHS e BSA – Reticulação e estabilização	13
1.4.3 Formação de bionanoconjugados	14
1.5 Teste de diagnóstico rápido (TDR).....	15
1.5.1 TDR para a detecção de anticorpos anti- <i>Pneumocystis jirovecii</i>	15
1.6 Principais métodos utilizados	16
1.6.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	17
1.6.2 Eletroforese em gel de agarose	17
1.7 Objetivos	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Preparação do antígeno rsm	19
2.1.1 Expressão do Antígeno rsm em <i>E. coli</i> XJb(DE3)	19
2.1.2 Purificação do antígeno rsm através de colunas IMAC.....	21
2.1.2.1 Otimização do procedimento de purificação por IMAC	21
2.2 Análise do antígeno rsm purificado.....	22
2.2.1 ELISA indireta (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	23
2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE).....	23
2.2.3 Western-Blot	24
2.2.4 Método do ácido bicinconínico (BCA)	24
2.3 Nanopartículas de ouro (AuNP)	25
2.3.1 Síntese química de nanopartículas de ouro.....	25
2.3.2 Caracterização de AuNP através de espectroscopia de UV-Vis	25
2.3.3 Funcionalização de AuNP	26

2.3.3.1	Funcionalização: AuNP-MUA e AuNP-CALNN	26
2.3.4	Conjugação com Antígeno rsm.....	26
2.3.4.1	Bionanoconjugados: AuNP-MUA-Antígeno e AuNP-CALNN-Antígeno	27
2.3.4.2	Bionanoconjugados: AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno.....	27
2.3.4.3	Bionanoconjugados: AuNP-MUA-BSA-Antígeno	27
2.4	Ligação antígeno rsm – soro policlonal anti-arsm	28
2.5	Eletroforese em gel de agarose a 0,3%	28
3	 RESULTADOS	29
3.1	Expressão e produção do antígeno rsm em <i>E. coli</i> XJb(DE3)	29
3.2	Purificação do antígeno rsm através de IMAC	29
3.3	Otimização da purificação do antígeno rsm através de IMAC	30
3.3.1	1º Ensaio: Comparação entre 8 tampões.....	31
3.3.2	2º Ensaio: Presença e ausência de glicerol	32
3.3.3	3º e 4º Ensaio: Alteração do tampão de lavagem e de ligação	33
3.3.4	5º Ensaio: HEPES pH 7,5 / Tris-HCl pH 8,0.....	34
3.3.5	6º Ensaio: Antígeno rsm para conjugação com AuNP	35
3.4	Síntese e caracterização de Nanopartículas de ouro	36
3.5	Funcionalização de Nanopartículas de ouro	37
3.5.1	Funcionalização com MUA ou CALNN.....	37
3.6	Conjugação de AuNP com antígeno rsm	38
3.6.1	Bionanoconjugados: AuNP-MUA-Antígeno / AuNP-CALNN-Antígeno.....	38
3.6.2	Bionanoconjugados: AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno.....	40
3.6.3	Bionanoconjugados: AuNP-MUA-BSA-Antígeno.....	41
3.7	Ligação antígeno rsm-soro policlonal anti-arsm	43
4	 DISCUSSÃO	45
4.1	Expressão e purificação do antígeno rsm em <i>E. coli</i> XJb(DE3).....	45
4.2	Bionanoconjugados compostos por antígeno rsm.....	49
4.3	Estudo da ligação do soro policlonal ao antígeno rsm	54
5	 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	55
6	 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7	 ANEXOS.....	61
7.1	Anexo I.....	61
7.2	Anexo II.....	62
7.3	Anexo III.....	65
7.4	Anexo IV	66
7.5	Anexo V	67
7.6	Anexo VI	68
7.7	Anexo VII	69
7.8	Anexo VIII	69
7.9	Anexo IX	70
7.10	Anexo X	70
7.11	Anexo XI	72
7.12	Anexo XII	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 Ciclo de vida de <i>P. jirovecii</i>. A. Fase de reprodução assexuada; B. Fase de reprodução sexuada. Adaptado de CDC, 2015	3
FIGURA 1. 2 Detecção de formas de <i>Pneumocystis</i> por imunofluorescência. 1) Quistos; 2) Trofozoítos. Adaptado de Thomas e Limper, 2004	6
FIGURA 1. 3 Efeito de SPR. Ressonância plasmônica de superfície. Adaptado de Yasun <i>et al.</i>, 2013	10
FIGURA 1. 4 Banda SPR de AuNP. A distância entre AuNP afeta o pico de SPR, originando um desvio de vermelho para azul, quando a distância interpartícula diminui. Adaptado de Almeida <i>et al.</i>, 2014	11
FIGURA 1. 5 AuNP-Citrato. Redução aquosa de um sal de ouro por uma solução de citrato de sódio, originando nanopartículas de ouro estabilizadas. Adaptado de Szunerits <i>et al.</i>, 2014	12
FIGURA 1. 6 Representação esquemática da estrutura molecular dos componentes utilizados na funcionalização de AuNP. A. ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA); e B. pentapéptido CALNN. Adaptado de Sperling e Parak, 2010.	13
FIGURA 1. 7 Representação esquemática do TDR para a detecção de anticorpos anti-<i>P. jirovecii</i>. A. TDR e respetivos componentes do teste; B. Teste positivo; C. Teste negativo.	16
FIGURA 2. 1 Produção e expressão do antígeno rsm em <i>E. coli</i> XJb(DE3)	20
FIGURA 3. 1 Gel de eletroforese SDS-PAGE a 15%. M. Marcador de pesos moleculares; 1. Sobrenadante (1º ciclo); 2. Sobrenadante (2º ciclo); 3. Sedimento ressuspendido com ureia; E. Extrato inicial após tampão de lise.	29
FIGURA 3. 2 Purificação com tampão Fosfato de sódio pH 7,4. Representação dos valores de absorvância obtidos através de ELISA indireta (405nm – preto) e Nanodrop ND-1000 (280nm - vermelho).	30
FIGURA 3. 3 Gel de SDS-PAGE a 15%. Purificação com tampão de lavagem, ligação e eluição Fosfato de sódio pH 7,4 (M. Marcador de peso molecular; 1. 1ª fração de eluição).	30
FIGURA 3. 4 Comparação entre 8 tampões. Gráfico representativo dos valores de absorvância a 405nm, provenientes dos ensaios ELISA resultantes da análise das frações da purificação por IMAC.	31
FIGURA 3. 5 Gel de SDS-PAGE a 15%. Comparação das frações de eluição, após purificação (M. Marcador de pesos moleculares; Tampão: 1. Fosfato de sódio pH 7,4; 2. MES pH 6,0; 3. MES pH 6,5; 4. HEPES pH 7,5; 5. HEPES pH 8,0; 6. Tris-HCl pH 8,0; 7. Tris-HCl pH 8,5; 8. Bicarbonato de sódio pH 8,5; E. Extrato inicial)	31
FIGURA 3. 6 Purificação por IMAC. A. Presença e B. Ausência de glicerol. Representação dos resultados obtidos por ELISA indireta (405nm) e resultante da análise dos produtos da purificação.	32
FIGURA 3. 7 Gel em SDS-PAGE a 15%. Purificação com 5% glicerol. A/B. M. Marcador de pesos moleculares; Fração de: 1. Lavagem, 2. Ligação, 3. Eluição; E. Extrato inicial. Purificação sem glicerol. C/D. M. marcador de pesos moleculares; Fração de: 1. Lavagem, 2. Ligação, 3. Eluição; E. Extrato inicial.	33
FIGURA 3. 8 Purificação por IMAC: HEPES pH 7,5 e Tris-HCl pH 8,0. A. Representação dos resultados obtidos por ELISA indireta (405nm) através da análise dos produtos da purificação por IMAC. B. Gel de SDS-PAGE a 15%. Purificação com Tris-HCl pH 8,0/HEPES pH 7,5. (M. Marcador de pesos moleculares; 1. Eluição com Tris-HCl pH 8,0; 2. Eluição com HEPES pH 7,5; E. Extrato inicial)	34
FIGURA 3. 9 Gel de SDS-PAGE a 15%. Purificação com Tampão de lavagem, ligação e eluição Tris-HCl pH 8,0. (M. Marcador de pesos moleculares; 1 a 10. Amostra final purificada; E. Extrato inicial)	35
FIGURA 3. 10 Gel de SDS-PAGE 15%. A. Purificação com Tampão Tris-HCl pH 8,0. (M - Marcador de pesos moleculares – Low Range Molecular Weight Standard Bio-Rad; 1 – 6: Amostra final purificada. B. Resultado das diálises: M. Marcador de pesos moleculares; 1. 1ª diálise; 2. 2ª diálise.	36
FIGURA 3. 11 Síntese de nanopartículas de ouro. A. Água Milli-Q (A); Adição da solução de ácido tetracloreáurico (B); após adição de citrato (C), (D); e no final da reação (E). B. Espectro de UV-Vis de AuNP, após síntese, que permitiu determinar o diâmetro médio e a concentração da solução de AuNP.	37
FIGURA 3. 12 Funcionalização – AuNP-MUA e AuNP-CALNN. A. Espectros UV-Vis de AuNP não funcionalizadas (AuNP-Citrato) e AuNP funcionalizadas com MUA (1:5000). B. Espectros UV-Vis de AuNP não funcionalizadas (AuNP-Citrato) e AuNP funcionalizadas com CALNN (1:1000)	38
FIGURA 3. 13 A. Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno, testados com razões molares [Antígeno]/[AuNP-MUA] desde 0 a 1500. Ânodo (-)/Cátodo (+) B. Mobilidade eletroforética (μ) avaliada através da aplicação informática eReuss. Representação de linha de tendência (vermelho). Desvio padrão representativo de triplicados.	39
FIGURA 3. 14 Espectroscopia de UV-Vis. Espectros obtidos para AuNP-Citrato (preto); AuNP-MUA (vermelho) e AuNP-MUA-Antígeno (azul), com os respetivos máximos da banda de SPR.	39
FIGURA 3. 15 A. Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados AuNP-CALNN-Antígeno, testados com razões molares [Antígeno]/[AuNP-CALNN] de 0 a 1500. Ânodo (-)/Cátodo (+) B. Mobilidade eletroforética (μ) avaliada através da aplicação eReuss. Desvio padrão representativo de triplicados.	40

FIGURA 3. 16 Espectroscopia de UV-Vis. Espectros obtidos para AuNP-Citrato (preto); AuNP-CALNN (verde) e AuNP-CALNN-Antigénio (laranja), com os máximos da banda de SPR.....	40
FIGURA 3. 17 Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados com razão molar [BSA]/[Antigénio] de 0,75 e razões molares de [BSA-Antigénio]/[AuNP-MUA] de 0 a 1500. A. AuNP-MUA-BSA. B. AUNP-MUA-BSA-Antigénio. Ânodo (-)/Cátodo(+) Mobilidade eletroforética (μ). C. AuNP-MUA-BSA-Antigénio (vermelho) e AuNP-MUA-BSA (preto). Linhas a contínuo correspondentes ao ajuste dos dados experimentais à equação de <i>Langmuir</i> , com desvio padrão representativo de triplicados.....	42
FIGURA 3. 18 A. Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Estudo de ligação de AuNP-MUA-BSA-Antigénio com soro contendo anticorpos anti-arsm após 1h de incubação, com razões molares [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antigénio] de 0 a 10. Ânodo(-)/Cátodo(+) B. Mobilidade eletroforética (μ) dos bionanoconjugados. Equação de <i>Langmuir</i> e desvio padrão representativo de triplicados.....	43
FIGURA 3. 19 A. Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Ligação dos BNCs a soro após 1h de incubação e 2 lavagens, com razões [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antigénio] de 0, 0,3 e 1,5. Ânodo (-)/Cátodo(+) B. Mobilidade eletroforética (μ) observada para AuNP-MUA (cinzento); AuNP-MUA-BSA (vermelho); AuNP-MUA-BSA-Antigénio (Ag) (preto). Desvio padrão representativo de triplicados.....	44
FIGURA I. 1 Vetor de expressão pLATE31. Adaptado de Tomás, 2014.....	61
FIGURA I. 2 Marcador de pesos moleculares composto por A. Albumina (<i>Sigma</i>); B. Ovalbumina (<i>Sigma</i>); C. Anidrase carbônica (<i>Sigma</i>); D. Tripsinogénio (<i>Sigma</i>); E. RNase A (<i>Roth</i>).....	65
FIGURA I. 3 Reta de calibração. Desvio padrão representativo de quadruplicados.....	68
FIGURA I. 4 Gel em SDS-PAGE a 15%. A. Tris-HCl pH 8,0 (M. Marcador de peso molecular; Lavagem e ligação com: 1. Fosfato de sódio pH 7,4; 2. Bicarbonato de sódio pH 8,5; E. extrato); B. HEPES pH 7,5 (M. Marcador de peso molecular; Lavagem e ligação com: 1. Fosfato de sódio pH 7,4; 2. Bicarbonato de sódio pH 8,5; E. extrato); C. HEPES pH 7,5/Tris-HCl pH 8,0 (M. Marcador de peso molecular; 1. HEPES pH 7,5; 2. Tris-HCl pH 8,0; E. extrato).....	69
FIGURA I. 5 Purificação por IMAC. A. Tris-HCl pH 8,0 ou B. HEPES pH 7,5. Representação dos resultados obtidos por ELISA indireta e resultante da análise dos produtos da purificação por IMAC.	69
FIGURA I. 6 Purificação por IMAC: Antigénio rsm para conjugação com AuNP. Resultados obtidos por ELISA indireta A. Utilização de 6mL de amostra; B. 2mL de amostra	69
FIGURA I. 7 Western-Blot: Resultados provenientes da aplicação do: A. Primeiro protocolo; B. Segundo protocolo. Representação do antigénio rsm com 16,7kDa e da proteína contaminante com 38kDa.	70
FIGURA I. 8 Espectroscopia de UV-Vis: Espectros obtidos com indicação da absorvância máxima de SPR. A. Tampão MES [1. 0,2mM EDC/0,2mM NHS; 2. 0,8mM EDC/0,8mM NHS; 3. 1mM EDC/1mM NHS; 4. 2mM EDC/2mM NHS]; B. Tampão PBS [1. 0,2mM EDC/0,8mM NHS; 2. 0,4mMEDC/1mM NHS; 3. 1mM EDC/3mM NHS; 4. 2mM EDC/5mM NHS]; C. Água Milli-Q [1. 0,2mM EDC/0,2mM NHS; 2. 0,4mM EDC/0,4mM NHS; 3. 0,8mM EDC/0,8mM NHS; 4. 1mM EDC/1mM NHS]; D. Tampão Fosfato de sódio (PB) [1. 0,1mM EDC/0,2mM NHS; 2. 0,2mM EDC/0,4mM NHS; 3. 0,4mM EDC/0,8mM NHS; 4. 0,5mM EDC/1mM NHS].....	70
FIGURA I. 9 Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio rsm, testados com razões molares de antigénio desde 0 a 1500 e diferentes tampões, tais como: A. Água Milli-Q [0,2mM EDC/0,2mM NHS]; B. Tampão PBS [0,2mM EDC/0,8mM NHS]; C. Tampão PB [0,4mM EDC/0,8mM NHS]; D. Tampão MES [1mM EDC/1mM NHS]. Ânodo (-)/Cátodo (+).....	71
FIGURA I. 10 Mobilidade eletroforética (μ) de bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio, avaliada através da aplicação <i>eReuss</i> . Desvio padrão representativo de triplicados. Bionanoconjugados com EDC/NHS: A. Água Milli-Q [0,2mM EDC/0,2mM NHS]; B. Tampão PBS [0,2mM EDC/0,8mM NHS]; C. Tampão PB [0,4mM EDC/0,8mM NHS]; D. Tampão MES [1mM EDC/1mM NHS].....	71
FIGURA I. 11 Espectroscopia de UV-Vis: Espectros obtidos para AuNP-Citrato; AuNP-MUA (1:5000) e bionanoconjugados com EDC/NHS em diferentes tampões (Índice de agregação; Pico da banda de SPR): 1. PBS (0,26; 526 nm); 2. Água Milli-Q (0,30; 528 nm); 3. PB (0,28; 526 nm); 4. MES (0,29; 527 nm).....	72
FIGURA I. 12 Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Migrações dos bionanoconjugados compostos por razões molares BSA por antigénio de 0 a 1. Razões molares de antigénio por AuNP: A. 150; B. 300; C. 450; D. 600. Ânodo (-)/Cátodo (+). E. Mobilidade eletroforética (μ). Desvio padrão representativo de triplicados.	72
FIGURA I. 13 Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados compostos por razões molares BSA/Antigénio (0,75; 1) e razões molares Antigénio/AuNP de 25 a 600. A/B. BSA por antigénio a 0,75. C/D. BSA por antigénio a 1. Ânodo (-)/Cátodo (+). Mobilidade eletroforética (μ) dos bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antigénio: Desvio padrão representativo de triplicados. Bionanoconjugados com: 1. BSA/Antigénio a 0,75; 2. BSA/Antigénio a 1.....	73
FIGURA I. 14 Eletroforese em gel de agarose a 0,3% e mobilidade eletroforética (μ) de AuNP-MUA-BSA-Antigénio-Soro. Ligação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antigénio (compostos pela razões molares 1:300:225 (AuNP:Antigénio:BSA)) a anticorpos anti-arsm após diferentes tempos de incubação: A. 1h a 4°C; B. 2h a 4°C; C. o/n a 4°C; e diferentes razões molares [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antigénio] de 0 a 15. Ânodo (-)/Cátodo (+). Representação da equação de <i>Langmuir</i> e desvios padrões representativos de triplicados.	74
FIGURA I. 15 Eletroforese em gel de agarose a 0,3% e mobilidade eletroforética (μ). Ligação de AuNP-MUA-BSA-Antigénio [razão molar 1:225:300] a anticorpos anti-arsm, com razões molares de [Soro]/[Antigénio] de 0 a 1,5: AuNP-MUA (cinzento); AuNP-MUA-BSA (vermelho); AuNP-MUA-BSA-Antigénio (preto) A. Sem lavagem; B. 1 lavagem; C. 2 lavagens. Ânodo (-)/Cátodo (+). Desvio padrão representativo de triplicados.	75

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. 1 Detecção de <i>Pneumocystis jirovecii</i> . Métodos de coloração histoquímica. Adaptado de Bennett, 2015; Thomas e Limper, 2004	6
TABELA 1. 2 Características do antígeno recombinante sintético multiepítipo.	8
<hr/>	
TABELA 2. 1 Ensaios de purificação por IMAC. Otimização da purificação do antígeno rsm.	22
<hr/>	
TABELA I. 1 Elementos genéticos constituintes do vetor de expressão <i>pLATE31</i> e funções.	61
TABELA I. 2 Composição do antígeno recombinante sintético multiepítipo. Adaptado de Tomás, 2014.	61
TABELA I. 3 Tampões de ligação e lavagem estudados.	62
TABELA I. 4 Tampões de eluição estudados.	62
TABELA I. 5 Combinação de tampões de lavagem, ligação e eluição utilizada no 2º ensaio.	63
TABELA I. 6 Combinação de tampão estudados no 3º e 4º ensaios.	64
TABELA I. 7 Constituição do marcador de pesos moleculares (<i>made in house</i>). <i>Mw</i> (do inglês, <i>Molecular weight</i>)	65
TABELA I. 8 Composição das soluções de separação e <i>stacking</i> que compõem o gel de SDS-PAGE a 15%.	66
TABELA I. 9 Concentração de proteína em estudo, proveniente do último ensaio de purificação efetuada.	67
TABELA I. 10 Concentração do antígeno rsm, após diálises, e do soro policlonal anti-arsm.	67
TABELA I. 11 Bionanoconjugados com EDC/NHS. Tampões e concentrações testadas para a sua formação.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

μ - Mobilidade eletroforética

Abs – Absorvância

Antigénio rsm – Antigénio recombinante sintético multiepítipo

AuNP – Nanopartículas de ouro

BCA – Método do ácido bicinonínico (do inglês, *Bicinconinic Acid Assay*)

BCIP - (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine*)

BNC - Bionanoconjugados

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

CDC – Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*)

CHAPS - 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamónia]-1-propanosulfonato

DHFR – Dihidrofolato reductase (do inglês, *Dihydrofolate reductase*)

DHPS – Dihidropteroato sintase (do inglês, *Dihydropteroate synthase*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

E. coli – *Escherichia coli*

EDC - Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EDTA – Ácido etilenodiamina tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EI – Expetoração induzida

ELISA – do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FITC – Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*)

Fw – *Forward*

IB – Corpos de inclusão (do inglês, *Inclusion Bodies*)

IFI – Imunofluorescência indireta

IL-6 – Interleucina 6

IMAC – Cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados (do inglês, *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*)

IPTG – do inglês, *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

LacO – Operação lac

LB – Meio Luria-Bertani

LBA – Lavado broncoalveolar

LDH – Lactato desidrogenase (do inglês, *Lactate dehydrogenase*)

LFA – Ensaio de fluxo lateral (do inglês, *Lateral Flow Assay*)

LPS – Lipopolissacarídeos (do inglês, *Lipopolysaccharide*)

SPR – Ressonância plasmónica de superfície (do inglês, *Surface Plasmon Resonance*)

Msg – Glicoproteína major de superfície (do inglês, *Major surface glycoprotein*)

mtLSU rRNA – Subunidade grande do RNA ribossómico mitocondrial (do inglês, *Mitochondrial Large Subunit ribosomal RNA*)

mtSSU rRNA – Subunidade pequena do RNA ribossômico mitocondrial (do inglês, *Mitochondrial Small Subunit ribosomal RNA*)

NHS - N-hidroxisuccinimida

NBT - (do inglês, *Nitro-blue tetrazolium chloride*)

o/n – *Overnight*

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio arterial

pb – Pares de bases

PB – Tampão Fosfato de sódio

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PBS-T – Tampão fosfato salino suplementado com detergente *Tween*

pI – Ponto isoelétrico

P. carinii – *Pneumocystis carinii*

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (do inglês, *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PPc – Pneumonia por *Pneumocystis*

rRNA – RNA ribossômico (do inglês, *Ribosomal ribonucleic acid*)

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real (do inglês, *Real-time quantitative PCR*)

Rv – *Reverse*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SIDA – Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

T CD4⁺ – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 4 (do inglês, *Cluster of differentiation 4*)

TARVc – Terapia anti retroviral de combinação

TDR – Teste de diagnóstico rápido

TMP – *Trimetoprim*

TMP-SMX – *Trimetoprim-Sulfametoxazol*

TNFα – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor alfa*)

UV-Vis – Ultravioleta-visível

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

1 | INTRODUÇÃO

1.1 | PNEUMOCISTOSE

A pneumocistose ou pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) é uma doença infecciosa causada por um fungo oportunista denominado *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*). Até 1980, a PPc era uma doença rara e unicamente observada em associação a casos de imunodeficiência intensa, como por exemplo em doentes com cancro ou transplantados. No entanto, com o desenvolvimento da epidemia da Síndrome de imunodeficiência adquirida (sida), a PPc tornou-se uma doença definidora de sida e uma preocupação fundamental, com cerca de 60% dos doentes infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) a apresentarem esta doença, sendo mortal para cerca de 25% destes doentes. (Helweg-Larsen, 2004) Após a introdução da profilaxia anti-PPc ainda nos anos 80 do século passado, e a introdução da terapêutica antirretroviral de combinação (TARVc) em 1996, observou-se uma redução da mortalidade e da incidência de infeções oportunistas. No entanto, a PPc permanece uma doença de extrema importância, ilustrando atualmente, desigualdades no acesso a cuidados médicos entre populações e grupos sociais, e no diagnóstico da infeção por VIH. Deste modo, a PPc destaca-se como uma infeção oportunista com alta morbidade e mortalidade. *P. jirovecii* é assim, um agente patogénico de distribuição ubíqua importante em doentes imunodeprimidos seropositivos e seronegativos para VIH. (Aliouat-Denis *et al.*, 2009; Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Helweg-Larsen, 2004)

1.1.1 | *Pneumocystis jirovecii*

O género *Pneumocystis* foi originalmente descoberto em 1909, no Brasil, pelo Dr. Carlos Chagas. (Chagas, 1909) A descoberta de formas quísticas de *Pneumocystis* em cortes histológicos foi acidental, quando este médico estudava *Trypanosoma cruzi* – parasita causador da tripanossomose humana americana ou doença de Chagas -, considerando que seriam parte do ciclo de vida daquele microrganismo. Em 1910, o investigador Antonio Carinii, encontrou formas microscópicas, semelhantes às encontradas por Carlos Chagas, em pulmões de roedores infetados por *Trypanosoma lewisi*, cuja comparação com amostras de pulmões de ratos não infetados, demonstrou que estas estruturas quísticas seriam representativas de uma nova identidade à qual, o casal Delanoe denominou, em 1912, *Pneumocystis carinii*, devido ao seu tropismo para os pulmões ("*Pneumo*"); pela sua forma quística ("*cystis*") e em homenagem ao biólogo italiano Antonio Carinii ("*carinii*"). (Redhead *et al.*, 2006; Delanoe e Delanoe, 1912)

Pneumocystis foi inicialmente caracterizado como protozoário, devido à morfologia das formas constituintes do ciclo de vida (forma trófica, forma quística e corpos intraquísticos) e à sensibilidade a fármacos ativos contra protozoários, como a pentamidina. (Stringer *et al.*, 2002) Contudo, em 1970, foi sugerida a natureza fúngica de *P. jirovecii*, tendo, em 1988, sido sequenciado o gene que codifica para a pequena subunidade do ácido ribonucleico ribossomal (16S rRNA) permitindo assim a confirmação da semelhança filogenética entre *Pneumocystis* com outros fungos unicelulares e a sua identificação como fungo atípico. *P. jirovecii* não apresenta ergosterol na sua membrana celular mas sim colesterol, que o impede de ser sensível a antifúngicos de largo espectro, como a anfotericina B,

normalmente atuantes na síntese de ergosterol. Além disso, apresenta na sua parede celular β -(1,3)-D-glucano, timidilato sintetase (TS) e dihidrofolato reductase (DHFR), à semelhança de *Sacharomyces cerevisiae* e contrariamente ao observado em protozoários. A nível filogenético apresenta unicamente um gene nuclear codificante de 16S rRNA ao contrário de outros fungos, que possuem várias cópias deste gene. (Kottom e Limper, 2000; Stringer, 1996; Edman *et al.*, 1988) Em 1994, e através do recurso a análises moleculares, tornou-se evidente que os microrganismos do género *Pneumocystis* são específicos de hospedeiro, apresentando diferenças genéticas em vários *loci* de acordo com o hospedeiro (nomeadamente em genes codificantes para as subunidades grande e pequena do rRNA (*mtLSU* e *mtSSU*)). (Redhead *et al.*, 2006; Helweg-Larsen, 2004) Em 1999, *Pneumocystis* humano, anteriormente designado *P. carinii* f. sp. *hominis*, passou a ser designado *Pneumocystis jirovecii*, em homenagem a Otto Jirovec, o primeiro investigador a classificar *Pneumocystis* como agente patogénico para o Homem, mantendo-se até hoje a seguinte classificação taxonómica: (Hibbett *et al.*, 2007; Redhead *et al.*, 2006; Stringer, 1996)

Super Reino: Eukaryota	Ordem: Pneumocystidales
Reino: Fungi	Classe: Pneumocystidomycetes
Sub-reino: Dikarya	Sub-filo: Taphrinomycotina <i>sensu</i>
Filo: Ascomycota	Género: <i>Pneumocystis</i>
Família: Pneumocystidaceae	Espécie: <i>Pneumocystis jirovecii</i>

1.1.2 / Morfologia e ciclo de vida

O estudo do ciclo de vida de *Pneumocystis* é principalmente baseado na observação de tecidos pulmonares infetados através de microscopia eletrónica de transmissão, devido à incapacidade de cultivo destes microrganismos *in vitro* por longos períodos de tempo e de forma reprodutível. (Aliouat-Denis *et al.*, 2008) *Pneumocystis* possui tropismo único para o pulmão, penetrando na cavidade pulmonar devido à sua capacidade de aderência às células alveolares não secretoras ou pneumócitos de tipo I, através das glicoproteínas de superfície MSG (do inglês, *Major Surface Glycoprotein*). A aderência do fungo à parede celular permite o desenvolvimento de um exsudado rico em formas tróficas, ocorrendo um espessamento da membrana alveolar e inflamação dos alvéolos e ductos alveolares. (Helweg-Larsen, 2004; Benfield *et al.*, 1997) No ciclo de vida de *Pneumocystis*, descrito na **FIGURA 1. 1**, podem ser identificadas, a forma quística e a forma trófica.

A **forma quística** ou esporo apresenta uma parede rígida e oval com diâmetro entre 4 e 7 μ m, que contém até oito corpos intraquísticos filhos (endósporos ou esporozoítos), os quais ao libertar-se da forma quística se designam formas tróficas. A **forma trófica** ou trofozoíto, encontrada em aglomerados, apresenta entre 2 e 8 μ m de diâmetro, pleomórfica com parede fina e projeções denominadas *filopodia*, cuja função (fixação, nutrição e/ou locomoção) não se encontra bem definida. Para além destas, foi também identificada uma **forma intermédia** denominada esporocisto ou pré-quísto, presente entre as formas trófica e quística, sobre a qual muito se questiona. (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Helweg-Larsen, 2004)

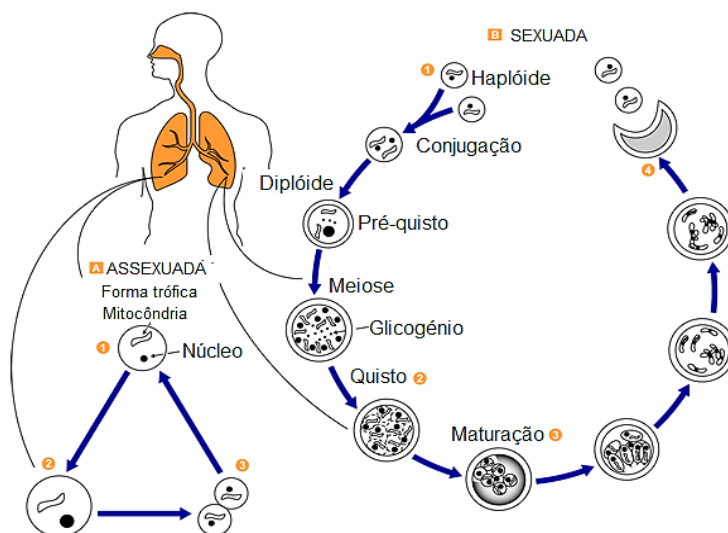


FIGURA 1. 1 | Ciclo de vida de *P. jirovecii*. A. Fase de reprodução assexuada; B. Fase de reprodução sexuada. Adaptado de CDC, 2015

O ciclo de vida é composto por duas fases distintas de replicação: uma fase de reprodução sexuada e uma de reprodução assexuada, as quais ocorrem unicamente *in vivo*. Na fase de reprodução sexuada (fase hipotética, ainda não demonstrada), ocorre a conjugação de duas formas tróficas haplóides originando uma célula diplóide (pré-quisto). Posteriormente, num processo de divisão meiótica seguido de replicação mitótica, forma-se uma forma quística imatura que amadurece, contendo oito corpos intraquísticos haplóides. De seguida, dá-se o desenquistamento, em que são libertados os corpos intraquísticos que se desenvolvem em novas **formas tróficas** no alvéolo pulmonar. Estas formas tróficas podem reproduzir-se por replicação assexuada (divisão binária). (Helweg-Larsen, 2004)

1.1.3 | Transmissão de *Pneumocystis jirovecii*

Após inalação pelo hospedeiro, *Pneumocystis* entra na cavidade pulmonar aderindo às células alveolares/pneumócitos de tipo I, formando-se um exsudado rico em trofozoítos. Este exsudado provoca uma reação por parte do sistema imunitário do hospedeiro com o espessamento da membrana alveolar, inflamação dos alvéolos e ductos alveolares causando edema e fibrose. (Benfield *et al.*, 1997; Pottratz *et al.*, 1991) A resposta inflamatória efetora e imunitária dirigida a *P. jirovecii* é necessária para o controlo da PPC, envolvendo interações entre linfócitos T CD4⁺, neutrófilos, citocinas – fator de necrose tumoral alfa (TNF α) - e quimiocinas (MIP-2) libertadas pelos macrófagos alveolares. Os macrófagos alveolares possuem um papel importante na imunidade inata e adaptativa, pois são mediadores inflamatórios de extrema importância por apresentarem como recetor a dectina-1, que reconhece β -glucano - principal componente da parede celular de *Pneumocystis* -, mediando a eliminação do microrganismo através da libertação acentuada de citocinas e quimiocinas. (Wang *et al.*, 2011) A resposta inflamatória do organismo é necessária para o desenvolvimento de um controlo eficiente contra a PPC. No entanto, a mesma resposta promove danos pulmonares severos, como inflamação pulmonar neutrofílica e hipoxia, que conduzem a insuficiência respiratória, verificando-se em vários casos uma correlação entre complicações respiratórias, ocorrência de morte, grau de

inflamação pulmonar e a carga parasitária presente no hospedeiro. (Aliouat-Denis *et al.*, 2008) Em imunocompetentes, descobriu-se que *P. jirovecii* tem a capacidade de se manter no pulmão, durante algum tempo, sem causar qualquer sintomatologia, sendo o processo dependente do sistema imunitário do hospedeiro. (Calderón *et al.*, 2010; Wakefield, 2002) Contudo, estes portadores assintomáticos devido ao facto de apresentarem nos seus pulmões *Pneumocystis*, são fontes de transmissão de microrganismos para outros indivíduos, comportando-se como “reservatórios”. (Helweg-Larsen, 2004) Considera-se atualmente que *P. jirovecii* se transmite por via aérea de indivíduo para indivíduo, permanecendo em dúvida a capacidade de *P. jirovecii* se propagar unicamente através e no hospedeiro humano ou se é capaz de se desenvolver noutra nicho ecológico fora do hospedeiro; excluindo-se, graças a análises genéticas/filogenéticas, a hipótese de transmissão através de outra espécie hospedeira, devido à sua especificidade intra-espécie. (Aliouat-Denis *et al.*, 2009; Helweg-Larsen, 2004; Wakefield, 1996)

1.1.4 / Diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

Apesar dos avanços no estudo de *P. jirovecii*, o diagnóstico da PPc apresenta obstáculos devido à inespecificidade dos sintomas e dos sinais da infeção e à possível ocorrência de infeções cruzadas com outros microrganismos. Em termos de sintomatologia, os doentes com PPc desenvolvem, normalmente, dispneia, febre, tosse seca não produtora de expectoração e mal-estar, no entanto, o quadro clínico é variável de pessoa para pessoa. Também se verifica em seropositivos para VIH, um início de doença geralmente subtil com sintomas como febre, dores pulmonares ou emagrecimento inexplicável, enquanto em indivíduos imunodeficientes seronegativos para VIH, o quadro clínico tem início súbito podendo progredir para insuficiência respiratória (Calderón *et al.*, 2010; Daly *et al.*, 2002) As manifestações extrapulmonares são extremamente raras, sendo a sua identificação efetuada pela observação de lesões quísticas calcificadas através de tomografia axial computadorizada ou ultrassonografia. (Huang *et al.*, 2011; Helweg-Larsen, 2004; Daly *et al.*, 2002)

1.1.4.1 / Diagnóstico diferencial

A avaliação laboratorial de rotina não específica, não fornece, geralmente, grande auxílio no diagnóstico da PPc. No entanto, com base nos sintomas e sinais existentes podem ser efetuados testes de função pulmonar, exames radiológicos, de gasometria arterial e testes laboratoriais, não específicos, como o doseamento da enzima lactato desidrogenase (LDH, do inglês *Lactate Dehydrogenase*). (Calderón *et al.*, 2010) Nos seropositivos para VIH, a PPc está geralmente relacionada com contagens de linfócitos T CD4⁺, parâmetro importante para determinar o risco para PPc, inferiores a 200 células/mm³. Quanto aos exames radiológicos, a característica mais comum em doentes com PPc (com e sem infeção por VIH), traduz-se por um infiltrado intersticial bilateral, o qual com o agravamento da infeção se torna mais homogéneo e difuso. (Thomas e Limper, 2004) O doseamento de LDH no soro dos doentes é um teste de rastreio e monitorização do tratamento, que permite a observação quantitativa de danos celulares ao nível do parênquima pulmonar, estando o aumento dos níveis de LDH relacionado com a destruição das membranas citoplasmáticas e com a reação inflamatória. No entanto, este doseamento não é específico para a PPc, podendo um aumento da LDH estar associado a outras doenças. (Calderón *et al.*, 2010; Rani *et al.*, 2000; Quist e Hill, 1995)

A gasometria arterial indica hipoxia com diminuição da pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂) e aumento do gradiente de oxigênio alvéolo-arterial, estabelecendo a gravidade da doença e permitindo direcionar o tratamento. A PaO₂ quando inferior a 65 mmHg é indicativa da presença de infecção. Outras estratégias de diagnóstico, como a medição dos níveis séricos de β -(1,3)-D-glucano, de KL-6 (do inglês, *Krebs von den Lungen-6*) ou de S-adenosilmetionina (SAM), já foram propostas para a distinção entre PPc e outras patologias. (Calderón *et al.*, 2010; Tasaka *et al.*, 2007) Infelizmente, os avanços no estudo da PPc encontram-se atrasados devido à: (1) inexistência de um sistema *in vitro* que possibilite a cultura de *P. jirovecii*; (2) às diferenças nos resultados obtidos em cada modelo animal, (devido às diferenças nas espécies infetantes para cada modelo); (3) à incapacidade de identificação do microrganismo fora do hospedeiro e (4) devido às amostras biológicas de obtenção difícil e invasiva. (Helweg-Larsen, 2004)

1.1.4.2 / Diagnóstico definitivo

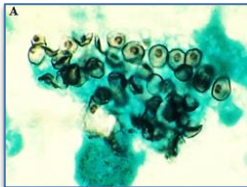
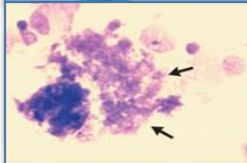
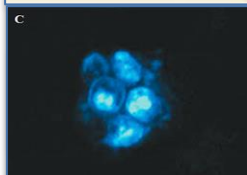
O diagnóstico clínico não é suficientemente específico para diferenciar a PPc de outras infecções pulmonares oportunistas, com possível ocorrência de reações cruzadas com outros agentes infecciosos, requerendo assim a utilização de técnicas de diagnóstico sensíveis e específicas, que permitam um resultado final fidedigno. Uma vez que não é possível efetuar a cultura *in vitro* de *P. jirovecii*, o diagnóstico definitivo consiste na detecção dos microrganismos em espécimes respiratórios. Como o microrganismo afeta os alvéolos pulmonares, espécimes do trato respiratório superior possuem baixa carga fúngica, sendo conveniente recorrer a espécimes do trato respiratório inferior, que são obtidos por métodos mais ou menos invasivos como a biópsia transbrônquica (**BTB**), lavado broncoalveolar (**LBA**) ou expetoração induzida (**EI**). (Huang *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2007; Helweg-Larsen, 2004; Bigby *et al.*, 1986)

Atualmente, o diagnóstico definitivo da PPc baseia-se na identificação de *P. jirovecii* através de técnicas de coloração histoquímicas em espécimes respiratórios por microscopia. Estas técnicas, contudo, são limitadas devido a apresentarem sensibilidades e especificidades variáveis. Numa tentativa de ultrapassar este problema, outros métodos de diagnóstico laboratorial da PPc têm vindo a ser desenvolvidos como a imunofluorescência direta/indireta com anticorpos monoclonais, e métodos moleculares, como a PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), começando-se, recentemente, a dar ênfase à investigação de técnicas de diagnóstico da PPc para aplicação em produtos biológicos de fácil obtenção, como o sangue. (Huang *et al.*, 2011; Tasaka *et al.*, 2007; Helweg-Larsen, 2004)

1.1.4.2.1 / Métodos de coloração histoquímica

Através da microscopia ótica é possível a utilização de vários métodos histoquímicos para a detecção deste microrganismo em espécimes biológicos. Os quistos de *P. jirovecii* podem ser detetados através da coloração pela metenamina de prata, calcoflúor, azul de toluidina ou *Wright-Giemsa*, representados na **TABELA 1. 1**. (Calderón *et al.*, 2010) Estas técnicas apresentam boa sensibilidade e especificidade, quando utilizadas em **LBA**, enquanto noutros espécimes biológicos obtidos do trato respiratório superior apresentam sensibilidade e especificidade baixas, devido às cargas fúngicas dos produtos biológicos serem baixas. (Huang *et al.*, 2011; Helweg-Larsen, 2004)

TABELA 1. 1 | Detecção de *Pneumocystis jirovecii*. Métodos de coloração histoquímica. Adaptado de Bennett, 2015; Thomas e Limper, 2004

	<p>Metenamina de prata (GMS)</p> <p>Cora de cinzento-escuro a parede dos quistos, não corando trofozoítos</p>
	<p>Wright-Giemsa ou Diff-Quick (Técnica modificada de coloração por Giemsa)</p> <p>Coloração de trofozoítos e corpos intraquísticos com obtenção de núcleos vermelhos e citoplasma corado de azul</p>
	<p>Calcoflúor</p> <p>Obtenção de uma coloração fluorescente, não específica, da parede quística</p>

1.1.4.2.2 / Imunofluorescência com anticorpos monoclonais

Outro método de coloração convencional utilizado no diagnóstico da PPC é a imunofluorescência (IF) direta ou indireta (IFI), que se fundamenta ou na utilização de anticorpos monoclonais específicos marcados com moléculas fluorescentes ou pela utilização de um conjunto de anticorpos - primário e secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) -, respetivamente, os quais reagem a antígenos de superfície de *P. jirovecii*, emitindo fluorescência de cor verde característica e permitindo a identificação do agente infeccioso. (Calderón *et al.*, 2010) A técnica de imunofluorescência é sensível, específica, rápida e fácil de utilizar, detetando tanto trofozoítos como quistos, sendo a técnica mais utilizada atualmente, e considerada de referência, no diagnóstico da PPC. Contudo, apresenta custos elevados relativamente às outras técnicas de coloração, requerendo um microscópio de fluorescência. (Matos *et al.*, 2006; Bava *et al.*, 2002)

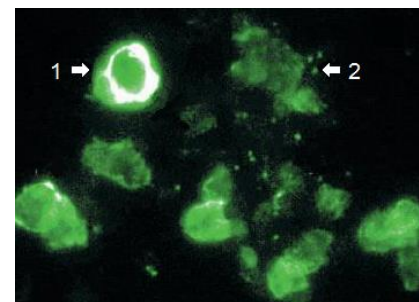


FIGURA 1. 2 | Detecção de formas de *Pneumocystis* por imunofluorescência. 1) Quistos; 2) Trofozoítos. Adaptado de Thomas e Limper, 2004

1.1.4.2.3 / Detecção molecular por PCR

Para a detecção de *P. jirovecii* é também possível efetuar métodos baseados em biologia molecular, com maior especificidade e sensibilidade do que os métodos de coloração, e com possibilidade de recurso a espécimes biológicos de obtenção menos invasiva. A técnica de PCR, descrita pela primeira vez em 1983 por Kary Mullis, é uma técnica de análise molecular que possibilita a amplificação de genes específicos em vários tipos de amostras, como soro e sangue. Com a PCR é possível fazer não só a detecção mas, também, a genotipagem de *P. jirovecii*, incluindo em casos de baixa carga fúngica. (Durand-Joly *et al.*, 2005; Matos *et al.*, 2001; Wakefield *et al.*, 1990) A PCR foi desenvolvida para o estudo de *Pneumocystis*, em 1990, por Ann Wakefield que descreveu a

amplificação do gene mitocondrial de RNA ribossomal (*mtLSU rRNA*) deste microrganismo. (Wakefield *et al.*, 1990) Para aumentar a sensibilidade desta técnica, têm sido desenvolvidos vários protocolos que permitem a escolha de diferentes alvos genéticos, como o gene *mtLSU rRNA* ou as sequências-alvo MSG, TS e DHFR. Também foram desenvolvidas técnicas como a PCR-*nested* e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) que permitem a obtenção de resultados qualitativos e quantitativos em relação à presença do microrganismo. (Huggett *et al.*, 2008; Helweg-Larsen, 2004) No entanto, mantém-se a dificuldade na distinção de colonização por *P. jirovecii* e PPc. (Huggett *et al.*, 2008)

1.1.5 / Tratamento de PPc

Ao longo dos anos tem-se observado, principalmente desde a introdução da terapêutica anti retrovírica de combinação (TARVc) em meados dos anos 90 do século passado, progressos no tratamento da PPc. Estes têm permitido o aumento da esperança média de vida dos doentes e um decréscimo na incidência de pneumocistose, em países industrializados. Em 1978, foi desenvolvido um regime terapêutico que envolve a administração da combinação trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) durante um período de três semanas – primeira linha de tratamento. (Calderón *et al.*, 2010) O TMP-SMX é a combinação de fármacos mais eficaz para o tratamento da PPc, pois atua sobre as enzimas DHPS e DHFR. No entanto, os efeitos adversos a esta combinação de fármacos são comuns e doentes com alergias às sulfamidas não podem efetuar esta terapêutica. Este tratamento é utilizado para uma alta gama de infeções o que aumenta a probabilidade de fenómenos de resistência e de infeções oportunistas resistentes, refletindo a necessidade de fármacos alternativos. (Calderón *et al.*, 2010; Helweg-Larsen, 2004; Sepkowitz *et al.*, 1992)

Devido à descoberta de mutações em genes específicos de *P. jirovecii* em resposta à terapêutica com sulfonamidas, nomeadamente mutações no gene de DHPS em doentes que receberam o tratamento com TMP-SMX, tem sido sugerida a existência de resistência de *P. jirovecii* a esta combinação. Mutações na DHPS estão associadas a resistência às sulfamidas, em diversos microrganismos, incluindo protozoários como *Plasmodium falciparum* e bactérias como *Streptococcus pneumoniae*, agravando os respetivos quadros clínicos, sugerindo a possibilidade da ocorrência de resistências, também, no caso de *P. jirovecii*. Pode também ser realizada uma terapêutica adjuvante com corticosteroides, benéfica em doentes seropositivos para VIH com PPc e grau moderado ou alto de hipoxia, diminuindo a resposta inflamatória pulmonar. Outras terapêuticas alternativas consideradas de segunda linha, baseiam-se na pentamidina, dapsona-trimetoprim, clindamicina-primaquina ou atovaquona. (Helweg-Larsen, 2004; Safrin *et al.*, 1996) Para além destas terapêuticas alternativas, as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) - fármacos antifúngicos – foram identificadas como inibidores da síntese de β -(1,3)-D-glucano demonstrando uma capacidade para a redução dos quistos sem toxicidade observável. (Lobo *et al.*, 2013; Beck e Cushion, 2009)

1.2 | GLICOPROTEÍNAS MAJOR DE SUPERFÍCIE (MSG)

Os antígenos de superfície de *P. jirovecii* são particularmente interessantes como biomarcadores moleculares, pois encontram-se na ligação entre hospedeiro e agente patogénico, sendo facilmente isolados e estudados, e apresentando um papel importante na resposta imunitária. (Stringer, 2005)

As glicoproteínas *major* de superfície (Msg) representam a maioria dos antígenos de superfície sendo encontradas, quer nas formas tróficas, que nas formas quísticas de *Pneumocystis*. (Stringer, 2005) São um complexo de proteínas altamente glicosiladas, apresentando hidratos de carbono ricos em manose, e com uma massa molecular de ≈ 100 kDa. Estes antígenos de superfície encontram-se envolvidos na interação hospedeiro-agente patogénico, através da ligação a moléculas do hospedeiro como a fibronectina e surfatantes, possibilitando a aderência aos pneumócitos de tipo I. (Stringer, 2005) Na sua totalidade, o genoma de *Pneumocystis* contém cerca de 100 genes codificantes de várias Msg, no entanto, é expressa uma única isoforma de cada vez durante os vários momentos da infeção, suspeitando-se que estas sejam ativadas através de mecanismos de regulação de transcrição. Particularmente importante tem sido o fragmento conservado que codifica para a região carboxilo-terminal de Msg, denominada fragmento MsgC. (Djawa *et al.*, 2010) A fração MsgC e as suas variantes, MsgC1, MsgC3, MsgC8, MsgC9 são fortemente reconhecidas por anticorpos no soro de doentes seropositivos para VIH com PPc, promovendo títulos altos de anticorpos em doentes seropositivos para VIH com PPc. (Gingo *et al.*, 2011; Daly *et al.*, 2006)

1.2.1 / Antígeno recombinante sintético multiepítopo

Com base nos estudos anteriormente apresentados, o antígeno recombinante sintético multiepítopo (rsm), produzido no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, resulta da seleção de três fragmentos hidrofílicos da região C-terminal da proteína Msg de *P. jirovecii*, ligados entre si por pontes de cinco resíduos de glicina. (Tomás *et al.*, 2016; Tomás, 2014) As pontes de glicina permitem criar duas ligações não reativas, possibilitando a obtenção de uma estrutura tridimensional que permite a interação entre os epítomos dos antígenos e anticorpos, encontrando-se na sua extremidade C-terminal uma cadeia poli-histidina (6xHis) que permite o processo de purificação por cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados. A **TABELA 1. 2** apresenta as características do antígeno rsm, nomeadamente o seu índice de instabilidade e hidropaticidade, que o qualificam como estável. Este antígeno foi sobreexpresso por um sistema recombinante de *E. coli*, permitindo a sua obtenção nas quantidades necessárias, garantindo a sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade dos ensaios. (Tomás, 2014)

TABELA 1. 2 | Características do antígeno recombinante sintético multiepítopo.

Parâmetros físico-químicos do antígeno recombinante sintético multiepítopo	
Mw (inglês, <i>Molecular weight</i>)	16,7 kDa
Número de aminoácidos	152
Ponto isoelétrico (<i>pI</i>)	8,57
Índice de instabilidade	38,39
Índice de hidropaticidade	- 0,702

1.3 | PROTEÍNAS RECOMBINANTES HIS-TAG E PURIFICAÇÃO POR IMAC

As proteínas recombinantes revolucionaram a indústria. Estas são de fácil construção e obtenção, partindo regularmente de um gene/sequência de interesse que é clonado num vetor de expressão à escolha, transformado num hospedeiro, sendo a cultura induzida resultante, purificada e

caracterizada, permitindo obter a proteína recombinante em altas quantidades e de forma reprodutível. No entanto, existem problemas relacionados com o processo como: baixo crescimento do hospedeiro, formação de corpos de inclusão – que requerem um passo de tratamento – e inatividade da proteína em estudo. Estes são dependentes principalmente do tipo de hospedeiro e vetor de expressão escolhidos. Os sistemas hospedeiros disponíveis incluem bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas unicelulares. *E. coli* é o hospedeiro mais utilizado por apresentar uma cinética de crescimento rápida que permite uma cultura em fase estacionária em poucas horas e obtenção de culturas de células com alta densidade. No entanto, a sua utilização apresenta algumas desvantagens que incluem a possível instabilidade dos vetores - aquando fermentação em larga escala -, toxicidade de alguns produtos genéticos, e *folding* proteico incorreto com consequente inatividade dos produtos. (Rosano e Ceccarelli, 2014; Gellissen, 2005) O antígeno em estudo, apresenta uma *affinity tag* de 6xHis. As *tag* para além de facilitarem o processo de purificação - que ocorre através do seu bioreconhecimento -, não interferem com a estrutura da proteína, podendo ser utilizadas para a imunodetecção do produto final purificado. (Rosano and Ceccarelli, 2014; Tomás, 2014)

Na presente dissertação, foi utilizada a cromatografia de afinidade com ião metálico imobilizado (IMAC), técnica que permite que iões metálicos imobilizados possam ser utilizados para fracionar e purificar proteínas. Esta é constituída por quatro passos consecutivos: (1) aplicação de tampão de lavagem; (2) amostra contendo a proteína recombinante; (3) seguida de aplicação de tampão de ligação; e por fim, (4) tampão de eluição. (Janson, 2011) Os primeiros dois tampões são tampões de equilíbrio que apresentam uma baixa concentração de imidazole, composto essencial a todo o processo de purificação, enquanto o tampão de eluição apresenta concentrações mais altas de imidazole, que compete com a ligação específica das proteínas *His-Tag* aos iões metálicos forçando a sua eluição. As proteínas *His-tagged* apresentam uma alta afinidade para os iões metálicos que são imobilizados nas colunas de cromatografia permitindo uma purificação de forma específica. A força de ligação entre as proteínas *His-tagged* e os iões metálicos imobilizados é controlada por fatores como a estrutura e características da proteína alvo, a presença e propriedades da *tag*, propriedades do ião metálico, pH e composição do tampão de ligação, os quais por sua vez influenciam o sucesso da purificação dos produtos proteicos. (GE Healthcare, 2009) A purificação das proteínas é também afetada pela localização do produto dentro do hospedeiro, que pode variar entre secreção proteica no meio de crescimento, no espaço periplasmático ou armazenamento em corpos de inclusão (*IB*, do inglês, *inclusion bodies*) insolúveis no citoplasma. Cada processo origina quantidades variáveis de proteínas celulares que precisam de ser removidas para obter uma proteína recombinante pura. Os *IB*, forma em que se encontra o antígeno rsm, são agregados insolúveis de proteínas que requerem um passo de solubilização – normalmente ureia que funciona como agente desnaturante e caotrópico – antes da purificação. (Rosano e Ceccarelli 2014; GE Healthcare, 2009) A concentração proteica é um passo necessário após purificação, existindo várias alternativas como: ultrafiltração (método mais comum); concentração de pequenos volumes de soluções proteicas através de diálise e ainda polímeros, como Polietilenoglicol (PEG) e FicollTM. (Janson, 2011)

1.4 | NANOPARTÍCULAS DE OURO: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

O avanço de áreas como a nanotecnologia e bionanotecnologia no contexto da saúde humana tem permitido ao longo dos anos o desenvolvimento de novos métodos que possibilitam a detecção de microrganismos e o diagnóstico de doenças com elevada sensibilidade e especificidade assim como o estudo e controlo da entrega de fármacos e de novas terapias. (Omidfar *et al.*, 2013) Os nanomateriais metálicos, como as nanopartículas de ouro (AuNP), são entidades com um diâmetro entre 1 e 100nm rodeados por um agente de revestimento e que apresentam propriedades óticas e eletrônicas - dependentes da sua composição, forma e tamanho - diferentes das que apresentariam à macro escala como: alta estabilidade, solubilidade em água, tamanho, dispersão e morfologia controláveis, assim como uma superfície de funcionalização simples e elevada área superficial. Todas estas propriedades estão diretamente relacionadas com o seu método de preparação, que permite o controlo da sua composição, forma e tamanho. (Sperling e Parak, 2010) Acima de todas as propriedades apresentadas pelas AuNP, as propriedades óticas como o alto coeficiente de extinção e a ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês, *Surface Plasmon Resonance*) são especialmente importantes no desenvolvimento de biossensores colorimétricos. (Almeida *et al.*, 2014)

A SPR é um fenómeno originado pela interação da radiação eletromagnética (campo oscilante) com uma superfície metálica, neste caso a solução coloidal de AuNP, ou seja, quando a frequência da onda eletromagnética é coincidente com a oscilação natural da nuvem de eletrões condutores presentes na superfície da AuNP, resulta numa ressonância plasmônica de superfície caracterizada por uma amplitude máxima de oscilação (**FIGURA 1. 3**). (Almeida *et al.*, 2014; Yasun *et al.*, 2013; Uechi e Yamada, 2008) Através da variação das características físico-químicas das AuNP - como a morfologia e função dielétrica do meio - e por meio da agregação das AuNP, é possível alterar o comprimento de onda da banda de amplitude máxima de SPR no espectro. (Huang e El-Sayed, 2010; Uechi e Yamada, 2008)

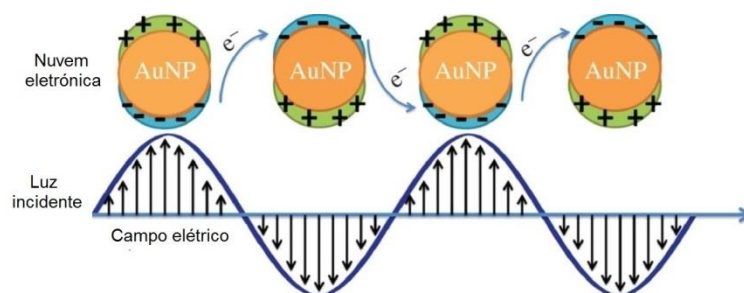


FIGURA 1. 3 | Efeito de SPR. Ressonância plasmônica de superfície. Adaptado de Yasun *et al.*, 2013

As forças que mantêm as AuNP em solução coloidal são repulsões electrostáticas, de exclusão estérica ou provenientes da uma camada de hidratação à superfície das nanopartículas. Para as AuNP, com cerca de 15nm, a solução coloidal apresenta um espectro de UV-Vis com uma banda de SPR com pico máximo de absorvância a cerca de 520nm de comprimento de onda, característico da cor vermelha. Assim, uma solução de AuNP, encontra-se em estado coloide, apresentando cor vermelha, ou num estado agregado, após destabilização das nanopartículas, apresentando cor azul-arroxeadado, resultante da deslocação da banda SPR para comprimentos de onda mais elevados (**FIGURA 1. 4**). (Baptista *et al.*, 2008; Haiss *et al.*, 2007)

Esta mudança de comprimento de onda das AuNP é a característica que permite a sua utilização como sondas óticas em diversas aplicações de detecção e diagnóstico, sendo dependente da variação de características físico-químicas das AuNP e da agregação. (Almeida *et al.*, 2014; Uechi e Yamada, 2008) O estado de agregação é potenciado por fatores como: (1) ausência de uma molécula de revestimento forte para estabilizar as nanopartículas; (2) presença de soluções com altas concentrações de sal e desestabilização da camada de hidratação, que levam à aproximação das nanopartículas através de forças atrativas, como forças de dipolo induzido (Van der Waals, pontes de hidrogénio); (3) ponto isoelétrico (*pI*) das moléculas à superfície da nanopartícula e pH da solução – permitem alteração ou cancelamento das cargas superficiais das AuNP. (Sperling e Parak, 2010)

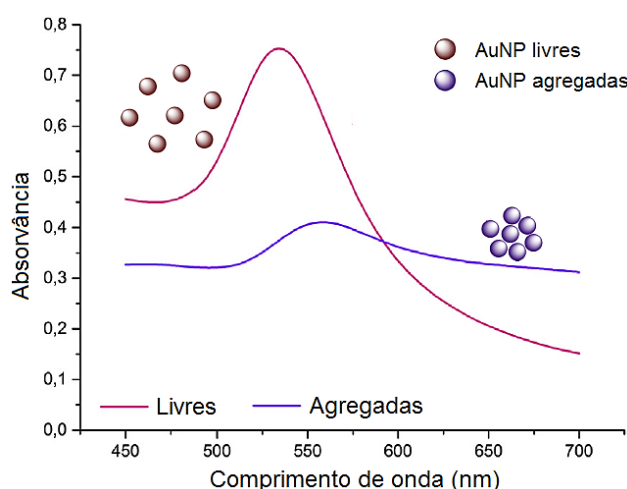
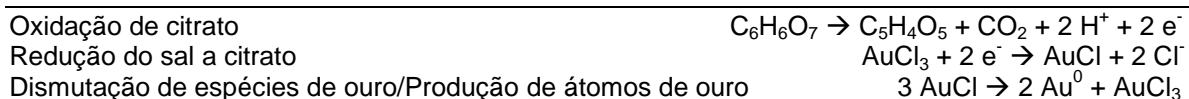


FIGURA 1. 4 | Banda SPR de AuNP. A distância entre AuNP afeta o pico de SPR, originando um desvio de vermelho para azul, quando a distância interpartícula diminui. Adaptado de Almeida *et al.*, 2014

As AuNP podem ser sintetizadas pela redução química ou eletroquímica de Au(III) na presença de um agente redutor, sendo o tamanho e a forma final das AuNP controlados pelas condições experimentais da síntese, nomeadamente, tipo de agente redutor utilizado, tempo de reação, temperatura reacional e agente de revestimento. Na presente dissertação, a síntese de AuNP esféricas com cerca de 15nm de diâmetro, baseou-se no método de Turkevich, proposto em 1951, e melhorado por Kimling. (Kimling *et al.*, 2006; Turkevich *et al.*, 1951) Neste método, o agente redutor é o citrato de sódio, que além de funcionar como redutor do sal de Au(III), reveste as AuNP obtidas, prevenindo a sua agregação. O agente redutor também possibilita o controlo sobre o tamanho e forma geométrica das AuNP, obtendo-se no final da síntese uma solução de AuNP com o tamanho numa gama entre os 10 e 20nm, e valor médio de 15nm. (Sperling e Parak, 2010) A preparação das AuNP é feita através da redução aquosa de um sal de Au(III) [HAuCl_4 ($\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$)] por uma solução de citrato de sódio, segundo a **EQUAÇÃO 1. 1**

EQUAÇÃO 1. 1 | Esquema de reações da síntese de nanopartículas pelo método de Turkevich.



O citrato de sódio (agente de revestimento), representado na **FIGURA 1. 5**, irá ligar-se à superfície das AuNP, estabilizando os núcleos, conferindo uma camada de iões carregados negativamente à sua superfície, impedindo a sua agregação através de forças repulsivas e, consequentemente, estabilizando as AuNP em solução coloidal. (Sperling e Parak, 2010)

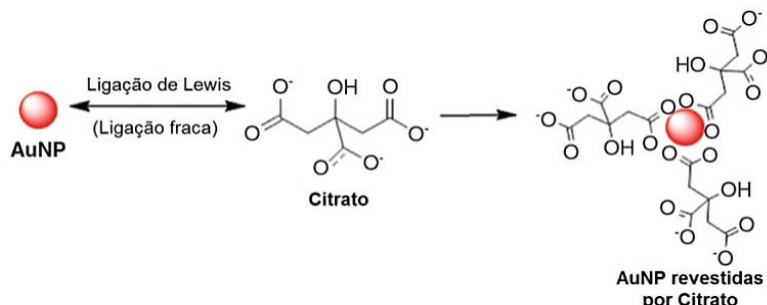


FIGURA 1. 5 | AuNP-Citrato. Redução aquosa de um sal de ouro por uma solução de citrato de sódio, originando nanopartículas de ouro estabilizadas. Adaptado de Szunerits *et al.*, 2014

1.4.1 / Funcionalização de nanopartículas de ouro

De modo a aumentar a estabilidade das AuNP, estas podem ser funcionalizadas. A funcionalização refere-se à modificação de uma superfície atribuindo-lhe características físico-químicas diferentes das originais, podendo os iões de citrato ser substituídos por um ligando bifuncional. Este ligando bifuncional apresenta numa extremidade a capacidade de estabelecer ligações fortes com a superfície da AuNP e, na extremidade oposta, uma funcionalidade química capaz de interação preferencial com a (bio)molécula com a qual se pretende conjugar. Os alcanotióis, moléculas utilizadas para a conjugação de nanopartículas com proteínas, possuem, numa das extremidades, um grupo tiol (-SH) que se liga covalentemente às nanopartículas e, na extremidade oposta, um grupo carboxílico (-COOH) que confere a carga negativa uniforme à superfície das AuNP e a possibilidade de formação de interações electroestáticas com biomoléculas. Na presente dissertação, foram estudados o alcanotiól ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), bem como o pentapéptido CALNN (Cisteína, Alanina, Leucina, Asparagina, Asparagina). (Franco e Pereira, 2012; Sperling e Parak, 2010)

MUA (FIGURA 1. 6A) é uma molécula bifuncional constituída por um grupo tiol (-SH) na extremidade N-terminal, uma cadeia alifática e um grupo carboxilo (-COOH) na extremidade C-terminal. A formação de uma camada densa de cadeias alifáticas em torno das AuNP, bem como a presença de grupos carregados ajudam na estabilização da solução coloidal. (Gomes *et al.*, 2012; Sperling e Parak, 2010) O grupo carboxilo estabiliza as AuNP por repulsão electrostática e o grupo tiol apresenta forte afinidade para a superfície de metais como o ouro. **CALNN (FIGURA 1. 6B)** apresenta uma elevada afinidade para o ouro, devido ao grupo tiol do seu resíduo de cisteína N-terminal, formando uma camada densa em torno das AuNP e contém um grupo hidrofílico em C-terminal que garante a estabilidade e a solubilidade das AuNP em água. O grupo tiol na extremidade N-terminal do resíduo cisteína (C) permite a formação de uma ligação covalente entre a biomolécula e a superfície das AuNP. Os resíduos alanina (A) e leucina (L) possuem cadeias laterais hidrofóbicas que promovem o acoplamento da biomolécula em estudo. Os dois resíduos asparagina (N) não

carregados apresentam grupos amida nas suas cadeias laterais hidrofílicas e um grupo carboxílico na extremidade C-terminal que confere estabilidade e solubilidade em soluções aquosas. (Lévy *et al.*, 2004)

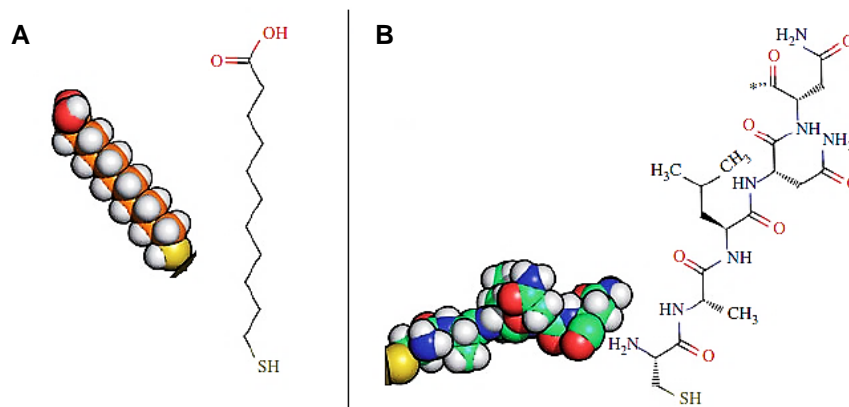


FIGURA 1. 6 | Representação esquemática da estrutura molecular dos componentes utilizados na funcionalização de AuNP. A. ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA); e **B.** pentapéptido CALNN. Adaptado de Sperling e Parak, 2010

1.4.2 / EDC/NHS e BSA – Reticulação e estabilização

No âmbito deste trabalho, para além do estudo da funcionalização de AuNP, foram também estudados dois compostos e a sua influência nas ligações formadas entre a AuNP e o antígeno rsm, com o qual se pretende formar bionanoconjugados: **EDC/NHS** – par de compostos utilizados na reticulação de proteínas - e **BSA** (do inglês, *Bovine serum albumine*) – para a estabilização de ligações entre AuNP e antígeno. A formação de uma ligação covalente do tipo ligação peptídica entre o grupo funcional das AuNP e a biomolécula a conjugar é uma ligação estável entre as biomoléculas e as AuNP, isto porque, a maior parte das proteínas contém grupos amina superficiais (provenientes, por exemplo, das cadeias laterais de resíduos de lisina), possibilitando a conjugação direta com as AuNP.

O **EDC** [Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] é uma das carbodiimidas mais utilizadas, catalisando a formação de ligações amida entre os grupos carboxi e amina. A adição do composto **NHS** [N-hidroxisuccinimida] estabiliza o intermediário formado pela reação com EDC, O-acilisourea, através da formação de grupos funcionais éster. Apesar de serem compostos com vantagens como a sua elevada solubilidade em água e facilidade de remoção dos produtos secundários, são extremamente dependentes de componentes como pH, e da razão EDC/NHS aplicada – pode ocorrer a perda de forças electrostáticas repulsivas resultando em agregação. (Conde *et al.*, 2014; Guirgis *et al.*, 2012; Bartczak e Kanaras, 2011) A **BSA** (66,6 kDa) é uma proteína monomérica solúvel em água, que efetua o transporte de vários compostos exógenos e endógenos incluindo hidratos de carbono, aminoácidos, esteroides e fármacos. É normalmente utilizada em bionanotecnologia como uma macromolécula inerte estabilizadora dos conjugados de ouro coloidal após a adsorção de anticorpos às AuNP, funcionando como um bloqueante e preenchendo as ligações vazias existentes, estando descrita a sua preferência por superfícies carregadas negativamente. Apesar, do ponto isoelétrico da BSA ser 4,6 – encontrando-se carregada

negativamente a pH 7, pH a que a maior parte das experiências nesta dissertação é realizada -, a BSA contém na sua superfície 60 grupos lisina que estão carregados positivamente e que estabelecem interações electrostáticas com componentes carregados negativamente, como as AuNP. Quanto à sua estrutura, a BSA é composta por 3 domínios e em cada um desses domínios existem 3 bolsos hidrofóbicos – os bolsos IIA e IIIA têm sido particularmente estudados pela sua capacidade de *docking* molecular. (Tsai *et al.*, 2011; Thobhani *et al.*, 2010)

1.4.3 / Formação de bionanoconjugados

As AuNP apresentam elevada biocompatibilidade e por isso, nos últimos anos têm sido alvo de elevado interesse em aplicações biológicas, nomeadamente em aplicações de biodiagnóstico. (Almeida *et al.*, 2014) Na natureza existe uma grande variedade de moléculas orgânicas disponíveis e passíveis de utilização para conjugação de AuNP, podendo adotar diferentes composições, tamanhos e complexidades, incluindo péptidos, açúcares, enzimas, DNA ou RNA. (Sperling e Parak, 2010)

A conjugação de biomoléculas às AuNP gera complexos denominados de bionanoconjugados (BNC) que permitem a formação de interações de forma específica com vários sistemas biológicos. Os bionanoconjugados compostos por AuNP-anticorpo ou antigénio apresentam funcionalidades únicas provenientes de ambos os materiais, como o tamanho e características óticas e magnéticas das AuNP juntamente com a elevada capacidade de reconhecimento de analitos específicos. (Quesada-González e Merkoçi, 2015; Arruebo *et al.*, 2009) Para a formação destes bionanoconjugados existem 4 tipos de estratégias adotadas relativamente à conjugação das biomoléculas às nanopartículas de ouro: Ligação à superfície da nanopartículas de ouro através de adsorção aos grupos tiol (-SH); adsorção electrostática das biomoléculas carregadas positivamente às AuNP funcionalizadas e carregadas negativamente; ligações por afinidade (não covalentes), como o sistema avidina-biotina; e por fim, ligação covalente através de conjugação química, explorando as possíveis ligações entre os grupos funcionais da nanopartícula e da biomolécula, por exemplo utilizando EDC/NHS. (Sperling e Parak, 2010) A ligação direta das biomoléculas às AuNP é também dependente da carga superficial, hidrofobicidade, tamanho e morfologia das mesmas, podendo originar alterações na conformação das biomoléculas em ligação à AuNP – observado por Tsai (2011) na ligação direta de BSA às AuNP. (Tsai, 2011) No presente trabalho, pretende-se desenvolver um bionanoconjugado inovador, composto pelo antigénio recombinante sintético multiepítopo (rsm), descrito anteriormente, ligado às AuNP - ao contrário dos bionanoconjugados observados regularmente na literatura e compostos por ligação AuNP-anticorpo. (Arruebo *et al.*, 2009; Byrne *et al.*, 2009)

A produção do antigénio recombinante e sintético provém não só da necessidade de garantir as quantidades necessárias para a criação do teste de diagnóstico rápido, mas também da necessidade do desenvolvimento de um antigénio com elevadas capacidades imunogénicas, formado pelas frações mais imunogénicas e que permita a detecção de anticorpos circulantes produzidos em resposta à presença de *P. jirovecii* no organismo humano. Estes anticorpos circulantes contra *P. jirovecii*, quando em contacto com o antigénio rsm desenvolvido, irão ligar-se com elevada afinidade. Assim, conjugando o antigénio rsm com as AuNP funcionalizadas, tornar-se-á possível detetar a

presença/ausência de infeção através do TDR a desenvolver. A utilização de bionanoconjugados compostos por AuNP em testes de diagnóstico beneficia das propriedades únicas que estas apresentam, descritas anteriormente, e que possibilitam não só uma deteção do analito alvo, como o desenvolvimento de um diagnóstico de rápido e de fácil utilização.

1.5 | TESTE DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (TDR)

Os bionanoconjugados têm duas grandes aplicações médicas: terapia e deteção, sendo esta última o foco da presente dissertação. O diagnóstico precoce possibilita uma ação rápida na prescrição de tratamento adequado permitindo a redução do número de pessoas infetadas, do número de mortes e um maior controlo da taxa de transmissão da doença. (Wild *et al.*, 2013; Wickramasinghe *et al.*, 2007) Os métodos mais comuns para o diagnóstico da PPc (secção 1.1.4.2), possibilitam um diagnóstico com especificidade e sensibilidade variáveis, necessitando de técnicos e equipamento especializado - raramente disponível em países subdesenvolvidos, impossibilitando o diagnóstico precoce necessário para o controlo da PPc - e baseiam-se em amostras obtidas de forma extremamente invasiva e dolorosa para o doente. De modo a obviar estes problemas, surgem os testes imunocromatográficos ou testes de diagnóstico rápido (TDR), que têm como objetivo principal tornar o diagnóstico um processo rápido, sensível, específico e barato, permitindo a obtenção de um resultado de fácil interpretação uma vez que não é necessário o recurso a técnicos especializados. (Wild *et al.*, 2013)

1.5.1 | TDR para a deteção de anticorpos anti-*Pneumocystis jirovecii*

O ensaio a desenvolver futuramente será um TDR imunocromatográfico de fluxo lateral ou LFIA (do inglês, *Lateral flow immunoassay*). Os imunoensaios em fluxo lateral permitem o rápido diagnóstico com obtenção do resultado em 5/10 minutos, podendo ser utilizados vários tipos de amostras complexas como urina, sangue, plasma ou saliva, permitindo a deteção de uma vasta gama de analitos como: agentes infecciosos (parasitas, bactérias, vírus), anticorpos contra agentes infecciosos, hormonas, toxinas, fármacos ou drogas. Este tipo de testes destaca-se pela sua portabilidade, baixo custo, alta sensibilidade e especificidade, permitindo a sua utilização em áreas remotas, onde o recurso a métodos e técnicos especializados para interpretação de resultados não é possível. Os testes LFIA são constituídos por vários segmentos hidrofílicos – zona de aplicação, zona de conjugação, zona de deteção e zona de absorção – que se encontram numa tira, o que garante o fluxo contínuo, sendo revestidos por um invólucro de plástico. (Wild *et al.*, 2013) O TDR em estudo na presente dissertação, é um teste qualitativo, que permitirá a obtenção de uma resposta positiva ou negativa para a presença de infeção por *P. jirovecii*, através do recurso a espécimes biológicos obtidos de forma não ou pouco invasiva, como o soro. As fontes de inovação deste TDR são o analito a detetar, nomeadamente anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii*, e o antigénio rsm, que permitirá a identificação da presença/ausência de infeção através da ligação específica aos anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii*. O TDR em desenvolvimento apresenta uma fase de captura de anticorpos circulantes específicos anti-*P. jirovecii*, utilizando uma superfície sólida como uma tira de nitrocelulose ou papel de filtro, onde são capturados pelos bionanoconjugados desenvolvidos e constituídos pelas AuNP funcionalizadas e conjugadas com o antigénio rsm.

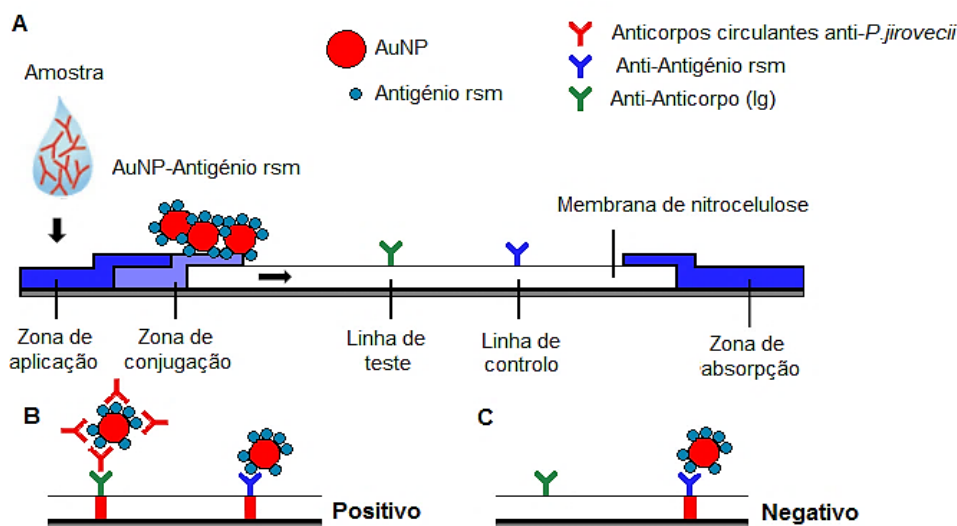


FIGURA 1. 7 | Representação esquemática do TDR para a detecção de anticorpos anti-*P. jirovecii*. A. TDR e respectivos componentes do teste; B. Teste positivo; C. Teste negativo.

O teste funcionará, como esquematizado na **FIGURA 1. 7**. Uma extremidade da tira de nitrocelulose/papel de filtro é imersa na amostra biológica líquida que contém os anticorpos circulantes específicos anti-*P. jirovecii* a detetar. A amostra percorre a superfície por capilaridade, arrastando os anticorpos circulantes nela contidos até à zona de conjugação. Posteriormente, vão-se ligar à zona de detecção, que contém a linha de teste - região com anti-Ig anti-*P. jirovecii* direcionado para os anticorpos circulantes contra os patógenos em estudo – e a linha de controlo - região com anticorpos específicos anti-antígeno rsm (anti-arsm). Ao percorrer a fita, o anticorpo circulante liga-se ao antígeno conjugado às nanopartículas de ouro (BNC) e o complexo recém-formado é deslocado no sentido do fluxo da amostra, ao longo da tira. O anticorpo anti-anticorpo Ig imobilizado, específico para os anticorpos circulantes, reconhece o anticorpo ligado aos bionanoconjugados, ocorrendo a acumulação do complexo na região da tira de nitrocelulose. A acumulação nesta região gera um sinal colorido vermelho.

O bionanoconjugado que não se ligou a anticorpos circulantes irá continuar a difundir ao longo da tira, sendo capturado por anticorpos específicos contra o antígeno rsm. À semelhança do sinal gerado para o complexo com anticorpos circulantes, a acumulação do antígeno rsm conjugado a AuNP gera um sinal colorido vermelho, que serve de controlo no teste LFIA. Sendo assim, para a obtenção de um teste positivo, é necessária existência de duas tiras vermelhas, tanto na linha de teste, como na de controlo, e para um teste negativo, a existência de unicamente uma tira vermelha, representativa da linha de controlo.

1.6 | PRINCIPAIS MÉTODOS UTILIZADOS

1.6.1 | ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

O método ELISA consiste num método imunoenzimático, desenvolvido por Eva Engvall e Peter Perlmann em 1971, para detecção e quantificação de uma proteína específica numa mistura

complexa. (Engvall e Perlmann, 1971) Este método permite a detecção de determinada substância, usualmente um antígeno, numa amostra líquida, através de reações com anticorpos marcados com enzimas, baseando-se o resultado final na alteração de cor relacionada com a interação entre ambos. A fosfatase alcalina ou a peroxidase são exemplos de enzimas frequentemente utilizadas. Os ensaios de ELISA são compostos por um sistema de captura, um analito e o sistema de detecção (espectrofotômetro). Os testes ELISA são regularmente utilizados para o diagnóstico de agentes infecciosos como parasitas, bactérias, vírus, proteínas, anticorpos ou hormonas, tendo-se em conta o tipo de ligação e tamanho do antígeno, a sensibilidade e precisão desejadas para a escolha da configuração mais adequada ao estudo, existindo quatro categorias de ensaios ELISA - imunométricos (direto, indireto e sandwich) e competitivos. (Gan e Patel, 2013; Jia *et al.*, 2009)

Na presente dissertação utilizou-se o formato de ELISA indireta, que envolve a imobilização do antígeno rsm na microplaca, o qual é posteriormente detetado por um anticorpo primário. Por último, um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina ligar-se-á ao anticorpo primário, originando na presença de substrato uma cor amarela, cuja intensidade é medida a 405nm, possibilitando a confirmação da presença do antígeno após a sua purificação através de IMAC.

1.6.2 / Eletroforese em gel de agarose

A técnica de eletroforese em gel de agarose é utilizada para separar sistemas biológicos como ADN e proteínas com alta resolução, no entanto, também permite a separação de nanomateriais, sendo utilizada em bionanotecnologia. (Xu *et al.*, 2007) A porosidade do gel de agarose é controlada pelo aumento ou diminuição da concentração de agarose utilizada na preparação do mesmo. Assim, uma alta concentração de agarose permite a obtenção de um gel com poros de tamanho pequeno e vice-versa, originando diferenças no gradiente de separação, e onde o processo de solidificação do gel resulta da formação de pontes de hidrogénio intra e intermoleculares entre cadeias de agarose. (Wilson e Walker, 2010) A mobilidade eletroforética das nanopartículas depende do tamanho e carga das nanopartículas, que se reflete na sua velocidade de migração e na força do campo elétrico aplicado. (Zheng *et al.*, 2015) A **Equação 1. 2** permite calcular a mobilidade eletroforética (μ em $\text{cm}^2/\text{V.s}$), onde v representa a velocidade de migração (cm/s) e E , o campo elétrico (V/cm).

$$\mu = \frac{v}{E} \quad \text{Equação 1. 2}$$

Na presente dissertação, a eletroforese em gel de agarose é utilizada para observação das diferenças na migração entre bionanoconjugados aquando alteração da concentração de antígeno presente ou da ligação de anticorpo aos bionanoconjugados AuNP-antígeno rsm. Assim sendo, a formação de bionanoconjugados AuNP-Antígeno rsm foi avaliada em eletroforese em gel de agarose. Às AuNP previamente funcionalizadas com MUA, CALNN, MUA-EDC/NHS, foram adicionadas diferentes razões molares de antígeno rsm e de antígeno rsm acoplado a BSA, sendo possível observar qual dos componentes presente em solução favorece a conjugação das AuNP ao antígeno rsm e determinar a razão molar de antígeno necessária para a obtenção de AuNP completamente revestidas com uma coroa de proteína.

1.7 | OBJETIVOS

As infeções fúngicas invasivas são uma causa importante de mortalidade e morbilidade, especialmente em doentes imunodeprimidos ou hospitalizados com doenças severas. A PPc é uma doença presente em hospedeiros com o sistema imunitário debilitado, como doentes seropositivos para VIH e doentes recentemente transplantados ou com cancro sob o efeito de tratamentos imunossupressores. (Lobo *et al.*, 2013) Como referido, a falta de sistema *in vitro* de cultivo de *P. jirovecii* aliado à especificidade de espécie; a ausência de deteção de *P. jirovecii* fora dos seus hospedeiros; e, por fim, o facto dos espécimes biológicos necessários para a deteção e diagnóstico de *P. jirovecii* e PPc, respetivamente, serem de obtenção invasiva, provocando desconforto ao doente, dificultam a obtenção de um diagnóstico definitivo. (Helweg-Larsen, 2004)

Pneumocystis jirovecii é um fungo atípico com um ciclo de vida bifásico e presente nos pulmões do hospedeiro ligado ao epitélio dos alvéolos pulmonares através dos pneumócitos de tipo I. Esta aderência é inicialmente mediada pelas glicoproteínas major de superfície (MSG) com cerca de 95-140kDa, antígenos mais abundantes na superfície de *Pneumocystis* com um papel crucial na interação com o hospedeiro e ativação de resposta imunitária, representando uma família de genes polimórfica com altos níveis de variação antigénica, que permitem o mecanismo de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro. (Helweg-Larsen, 2004) Estudos sobre a MSG recaem num fragmento recombinante relativamente conservado que codifica a região C-terminal, denominada fragmento MsgC e que demonstra resultados promissores para imunodiagnóstico da PPc (Djawa *et al.*, 2010; Daly *et al.*, 2004) A disponibilidade de um teste fiável e sensível para deteção de *P. jirovecii* proporcionaria um grau de especificidade superior e substituiria os métodos de amostragem invasiva utilizados.

Assim, e dando seguimento ao trabalho desenvolvido anteriormente com supervisão conjunta dos laboratórios da Professora Doutora Olga Matos (e Inv. Fernando Cardoso, IHMT/UNL), do Professor Doutor Ricardo Franco (e Dr^a. Inês Gomes, UCIBIO e FCT/UNL) e da Professora Doutora Eulália Pereira (e Mestre Miguel Peixoto de Almeida, UCIBIO e FCUP), a presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de bionanoconjugados robustos constituídos por nanopartículas de ouro (AuNP) e antígeno sintético recombinante multiepítopo (rsm) específico que permitirão a criação de um TDR imunocromatográfico em fluxo lateral para a deteção de anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii* no soro de doentes. Para tal, efetuou-se a expressão, produção e purificação do antígeno recombinante sintético multiepítopo, anteriormente desenvolvido a partir de epítomos hidrofílicos da região C-terminal da proteína MSG de *P. jirovecii*. (Tomás *et al.*, 2016; Tomás, 2014) E, conjugou-se com as AuNP para a formação de bionanoconjugados AuNP-Antígeno rsm. Por fim, a capacidade de interação dos bionanoconjugados a amostras serológicas foi testada através da observação de ligação específica entre os bionanoconjugados a soro policlonal anti-arsm.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 | PREPARAÇÃO DO ANTIGÉNIO RSM

No presente estudo, foi necessário expressar, produzir e purificar o antígeno recombinante sintético multiepítipo (rsm), procedendo-se de seguida à síntese das nanopartículas de ouro (AuNP), funcionalização e conjugação das mesmas, para a formação dos bionanoconjugados.

2.1.1 | Expressão do Antígeno rsm em *E. coli* XJb(DE3)

A sequência do antígeno rsm encontrava-se inserida no vetor de expressão *pLATE31*, em *Escherichia coli* BL21Star(DE3), tendo sido este posteriormente clonado em *E. coli* XJb(DE3). (Tomás *et al.*, 2016; Coutinho, 2015; Tomás, 2014) O vetor de expressão *pLATE31*, permitiu a expressão do antígeno rsm com uma cauda de seis histidinas na extremidade C-terminal. Os elementos genéticos que compõem o vetor de expressão e as suas funções bem como a constituição em aminoácidos do antígeno rsm, encontram-se no **Anexo 7.1** (pág. 61). As células transformadas e individualizadas de *E. coli* XJb(DE3) com o vetor de expressão *pLATE31* foram inoculadas em placas de Petri com meio LB-Agar com 100µg/mL de ampicilina, tendo sido posteriormente armazenadas a -80°C para manutenção da sua viabilidade. O estudo de expressão e produção do antígeno rsm em *E. coli* XJb(DE3) prosseguiu através da repicagem de colónias transformadas. (Coutinho, 2015)

Com o intuito de isolar colónias de células transformadas, repicou-se em placa de Petri com meio *Luria Broth-agar* (Nzytech) com ampicilina (100µg/mL; Nzytech), 22 colónias transformadas de *E. coli* XJb(DE3) contendo o vetor de expressão *pLATE31*. Incubou-se o/n a 37°C, verificando-se o aparecimento de colónias individualizadas. Após incubação, uma colónia isolada foi inoculada em 4mL de meio *LB Broth* (Nzytech) com ampicilina a 100µg/mL, deixando-se a incubar o/n a 4°C. Posteriormente, o pré-inóculo 2 foi diluído em 35mL de meio *LB Broth* com ampicilina (100µg/mL) e incubou-se durante 5h a 37°C, com agitação de 2g (*Shaker SK-300, Lab. Companion*). No final, foi novamente diluído em 100mL de meio *LB Broth* com ampicilina (100µg/mL), deixando-se a incubar o/n a 37°C com agitação de 2g (*Shaker SK-300, Lab. Companion*). Findo este período, o inóculo foi diluído em 600mL de meio *LB Broth* com ampicilina (100µg/mL). Incubou-se a 37°C com agitação de 2g (*Shaker SK-300, Lab. Companion*), até atingir a densidade ótica (OD, do inglês, *Optical Density*) entre 0,6 – 1, a 600nm, correspondente à fazer exponencial da curva de crescimento celular. Quando o crescimento bacteriano atingiu a OD pretendida, foi induzida a expressão da proteína em estudo na presença de 1mM de isopropil-tio-β-D-galactosídeo (IPTG; *Fischer-Scientific*) e deixou-se a incubar durante 3h, a 37°C com agitação de 2g (*Shaker SK-300, Lab. Companion*).

O ensaio de crescimento bacteriano foi efetuado em duplicado e dividiu-se igualmente o volume, armazenando-se a 4°C. O volume de crescimento bacteriano induzido de cada *falcon* foi centrifugado a 5000g durante 10min (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000). O sobrenadante foi descartado e cada sedimento foi ressuspenso em 7mL de meio LB fresco com ampicilina (100µg/mL), L-arabinose (3mM; *Zymo Research*), cloranfenicol em DMSO (100µg/mL; *Sigma-Aldrich*) e IPTG (0,2mM; *Fischer-Scientific*), seguido de um período de incubação de 2h30min, a 30°C com agitação de 2g (*Shaker SK-*

300, Lab. Companion). Por fim, centrifugou-se à temperatura ambiente, durante 10min a 5000xg (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000), descartando-se o sobrenadante. Para ressuspender o sedimento adicionou-se 5mL de tampão de lise [10mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM KCl (*VWR*); 1mM EDTA; 1% Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*); 0,5% CHAPS (*Roth*)] juntamente com 0,2mM Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF; *Sigma-Aldrich*), 2mM CaCl_2 (*Sigma-Aldrich*) e 0,02µg/mL DNase I (*Sigma-Aldrich*) e congelou-se a -20°C. O procedimento encontra-se representado na **FIGURA 2. 1**.

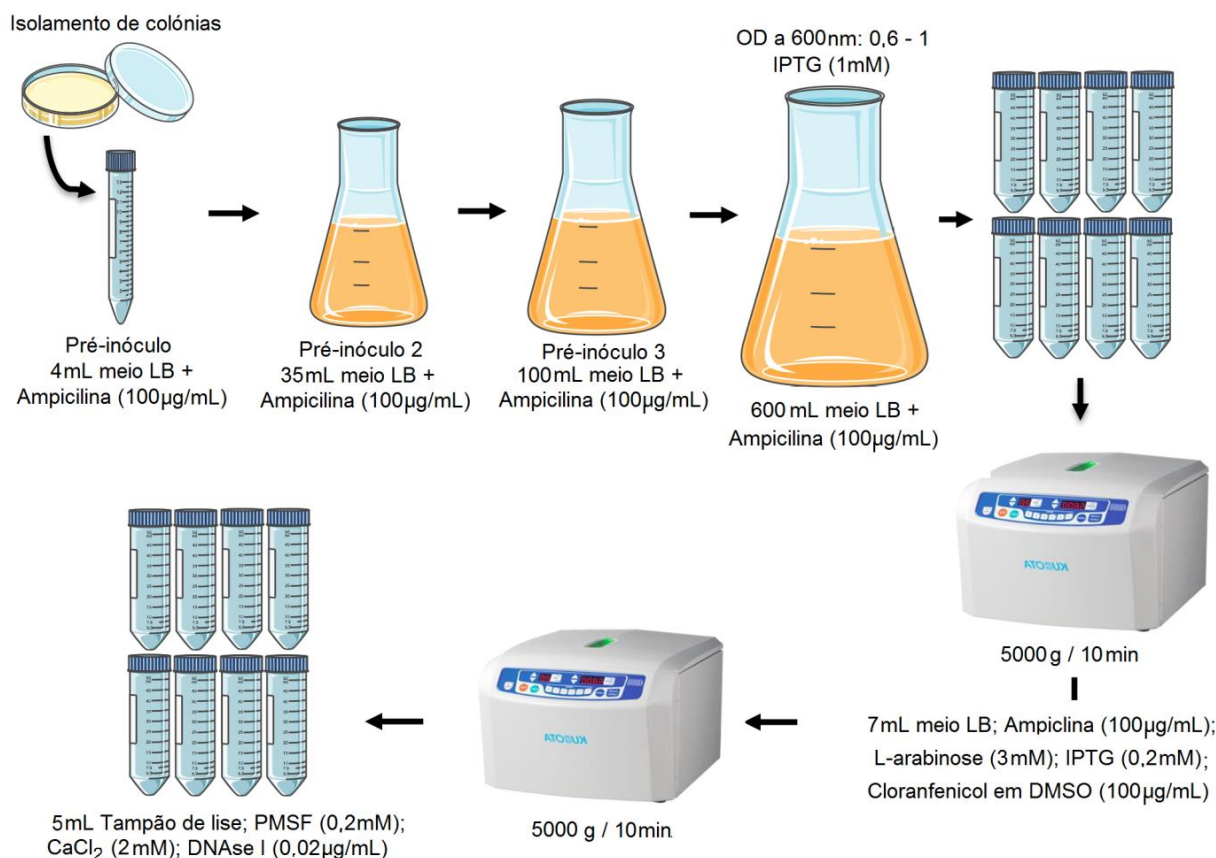


FIGURA 2. 1 | Produção e expressão do antígeno rsm em *E. coli* XJb(DE3).

De forma a promover a lise das membranas celulares, procedeu-se a um ciclo de congelação e descongelação. Começou-se por descongelar à temperatura ambiente os *falcons* e adicionou-se 1mL de tampão de lise. Centrifugou-se a 5000g (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000) durante 15min à temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 2mL de tampão de lise, efetuando-se novamente um ciclo de congelação a -20°C durante 30min. Findo esse ciclo, centrifugou-se à temperatura ambiente durante 15min a 5000g (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000), descartando-se novamente o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento em 6mL de 8M Ureia (*Sigma-Aldrich*) de modo a solubilizar os corpos de inclusão. Centrifugou-se novamente à temperatura ambiente, durante 15min a 5000g (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000), descartou-se o sedimento e o sobrenadante foi recolhido para posterior purificação, tendo sido armazenado a -20°C. Foi também recolhida uma alíquota de cada sobrenadante e sedimento, para se avaliar o resultado da lise celular e confirmar a presença do antígeno por eletroforese em gel de SDS-PAGE (15%).

2.1.2 / Purificação do antígeno rsm através de colunas IMAC

Para proceder à purificação do antígeno rsm foi utilizada uma coluna de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC, do inglês, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), originariamente com resina de íão níquel (Ni^{2+}), removida e substituída por uma resina com íons de Cobre (Cu^{2+}), essencial para a purificação de proteínas recombinantes marcadas com histidina. Na presente dissertação, uma coluna de cromatografia *HiTrap* de 1mL (*GE Healthcare Life Sciences*) foi empacotada com 1mL de resina *Ni Sepharose 6 FastFlow* (*GE Healthcare Life Sciences*). Antes da purificação, a coluna de cromatografia foi lavada com 5mL de tampão de remoção [20mM Fosfato de sódio (Na_2HPO_4 ; *Merck*); 500mM Cloreto de sódio (NaCl ; *Nzytech*); 50mM EDTA (*Sigma-Aldrich*); pH 7,4] de modo a substituir todo o níquel original da coluna por íão cobre, permitindo obter melhores resultados em relação à purificação deste antígeno recombinante. De seguida, a mesma coluna foi lavada com 10mL de água *Milli-Q*, 5mL de Hidróxido de sódio [NaOH ; 0,1M; *Merck*] e 15mL de água *Milli-Q*.

No final, foi adicionado 3mL de 0,1M de sulfato de cobre penta-hidratado (*Merck*). A coluna foi colocada a 4°C durante 30min, e antes de nova utilização lavada com 20mL de água *Milli-Q*. Inicialmente, testou-se o tampão fosfato de sódio a pH 7,4, como tampão de ligação, lavagem e eluição. A coluna IMAC com resina com íons Cu^{2+} foi previamente equilibrada com 10mL de tampão de lavagem fosfato de sódio pH 7,4 [20mM Na_2HPO_4 ; 500mM NaCl ; 20mM Imidazole (99%, *Sigma*); pH 7,4]. De seguida, a 2mL de amostra lisada adicionou-se 670µL de tampão de ligação e a amostra foi aplicada na coluna. Aplicou-se 10mL de tampão de ligação Fosfato de sódio pH 7,4 [20mM Na_2HPO_4 ; 500mM NaCl ; 20mM Imidazole; pH 7,4], para garantir que todas as proteínas ligadas não especificamente à coluna são eliminadas. Por fim, aplicou-se 20mL de tampão de eluição Fosfato de sódio pH 7,4 [20mM Na_2HPO_4 ; 500mM NaCl ; 500mM Imidazole; pH 7,4]. O aumento da concentração de imidazole influencia o modo como a cauda de histidina do antígeno rsm está fixa aos íons de cobre presentes na coluna, permitindo a sua eluição de forma específica. Durante todo o processo foram recolhidas frações contínuas de 1mL e armazenadas a 4°C. De seguida, mediu-se a absorvância a 280nm, através de UV-Vis, recorrendo ao *Nanodrop ND-1000* (*Thermo Scientific*). Em cada ensaio, obteve-se 10mL de antígeno purificado.

2.1.2.1 / Otimização do procedimento de purificação por IMAC

Uma vez que o antígeno rsm será utilizado na formação de bionanoconjugados foi necessário proceder-se à otimização da purificação do mesmo assegurando o sucesso dos posteriores estudos de detecção. Procedeu-se então à otimização da purificação de forma a obter o antígeno na forma mais pura possível. Realizaram-se seis ensaios diferentes, pormenorizadamente descritos no **Anexo 7.2** (pág. 62). A **TABELA 2. 1** resume as diferentes combinações de tampões testados e variados nos ensaios. O antígeno rsm purificado com Tris-HCl pH 8,0 no sexto, e último, ensaio foi utilizado na continuação do trabalho e conjugação com as nanopartículas de ouro.

TABELA 2. 1 | Ensaios de purificação por IMAC. Otimização da purificação do antígeno rsm.

Ensaio	Tampão de lavagem e ligação	Tampão de eluição
1º Ensaio Comparação entre 8 tampões	Fosfato de sódio pH 7,4	Fosfato de sódio pH 7,4
	MES pH 6,0	MES pH 6,0
	MES pH 6,5	MES pH 6,5
	HEPES pH 7,5	HEPES pH 7,5
	HEPES pH 8,0	HEPES pH 8,0
	Tris-HCl pH 8,0	Tris-HCl pH 8,0
	Tris-HCl pH 8,5	Tris-HCl pH 8,5
	Bicarbonato de sódio pH 8,5	Bicarbonato de sódio pH 8,5
2º Ensaio Presença e ausência de glicerol	HEPES pH 7,5	HEPES pH 7,5
	HEPES pH 8,0	HEPES pH 8,0
	Tris-HCl pH 8,0	Tris-HCl pH 8,0
	Tris-HCl pH 8,5	Tris-HCl pH 8,5
3º Ensaio Alteração de tampão de lavagem e ligação	Fosfato de Sódio pH 7,4	
	Bicarbonato de Sódio pH 8,5	HEPES pH 7,5
	HEPES pH 7,5	
4º Ensaio Alteração de tampão de lavagem e ligação	Fosfato de Sódio pH 7,4	
	Bicarbonato de Sódio pH 8,5	Tris-HCl pH 8,0
	Tris-HCl pH 8,0	
5º Ensaio HEPES pH 7,5 / Tris-HCl pH 8,0	HEPES pH 7,5	HEPES pH 7,5
	Tris-HCl pH 8,0	Tris-HCl pH 8,0
6º Ensaio Purificação final de antígeno rsm	Tris-HCl pH 8,0	Tris-HCl pH 8,0

2.2 | ANÁLISE DO ANTIGÉNIO RSM PURIFICADO

Por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*), a 15%, foi possível observar a presença do antígeno rsm em cada fração do volume eluído, durante a purificação, e determinar a sua pureza. Os volumes de cada fração eluída, resultantes dos ensaios de purificação, foram dialisados numa fita de diálise com porosidade 12,400 MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*, D-0655, *Sigma*), com o objetivo de remover o imidazole e o excesso de NaCl da solução que contém o antígeno, o/n a 4°C seguido de 4h em agitação a 4°C, alterando o tampão em que se encontra o antígeno para tampão Tris-HCl pH 8,0 [10mM Tris-Base (99%, *Applichem*); 20mM NaCl; 2%(v/v) glicerol (87%, *Merck*); pH 8,0].

Efetou-se, posteriormente à diálise, a concentração dos volumes de antígeno purificado com PEG8000 (*Sigma*), o/n a 4°C, através da aplicação de PEG por cima da fita de diálise. Para a quantificação da concentração final do antígeno rsm procedeu-se ao método de BCA. Numa tentativa de compreender a origem de uma proteína “contaminante” presente nas amostras, com cerca de 38kDa, foi efetuado *Western-Blot*.

2.2.1 / ELISA indireta (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Numa microplaca de ELISA de 96 poços, transparente de fundo raso (*Greiner*), adicionou-se 50µL de cada fração obtida dos passos da purificação do antígeno rsm, em duplicado. Deixou-se incubar a 37°C durante 1h. Seguidamente lavou-se a microplaca, uma vez, com tampão fosfato salino, PBS 1x [do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*; 137mM NaCl; 2,7mM KCl (*Sigma*); 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM Fosfato de potássio (KH₂PO₄; *Merck*); pH 7,4]. Posteriormente, adicionou-se 50µL de soro policlonal primário diluído 1:400 em PBS-Tween 1x [PBS 1x; 0,025% Tween-20 (*Merck-Schuchardt*)]. Este soro é um soro policlonal anti-arsm *made in house* através da imunização de murganhos Balb/C com o antígeno recombinante multiepítipo sintético, tendo-se isolado o antígeno diretamente de géis SDS-PAGE a 15% e injetando-se de seguida nos murganhos Balb/C juntamente com adjuvante incompleto de Freud (*Sigma*). (Tomás, 2014) Deixou-se a incubar o soro primário policlonal a 37°C, durante 1h. No final, verteu-se a microplaca e lavou-se com PBS-Tween 1x, três vezes seguidas, de modo a remover o excesso de anticorpo e eliminar ligações inespecíficas. Posteriormente, adicionou-se 50µL de anticorpo secundário, um anti-IgM anti-rato conjugado com enzima fosfatase alcalina e produzida em cabra (A-7784, *Sigma Immuno Chemicals*) diluído 1:10.000 em PBS-Tween 1x. Incubou-se a 37°C, durante 1h e após este período, a microplaca foi lavada três vezes com PBS-Tween 1x e uma quarta vez com água para remover o excesso de anticorpo secundário. Adicionou-se 50µL de substrato 4-nitrofenilfosfato dissódico (4NPP, *AppliChem*) diluído a 1mg/mL em tampão substrato [10mM Dietanolamina (*Sigma-Aldrich*); 0,5mM MgCl₂ (*Sigma-Aldrich*); pH 9,8] e deixou-se incubar a 37°C durante 1h. O resultado do ensaio foi determinado pela leitura da absorvância a 405nm, no leitor de microplacas *Infinite 200 Pro* da *Tecan*, permitindo inferir sobre a presença do antígeno. Todo este processo foi efetuado em duplicado.

2.2.2 / Eletroforese em gel de poli(acrilamida) a 15% (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes, a 15%, permite analisar a pureza do antígeno em estudo, assim como o seu peso molecular. (Wilson e Walker, 2010) Os géis constituídos por acrilamida/bis-acrilamida (30%(m/m); *Nzytech*) numa proporção de 37,5:1, foram corridos recorrendo aos equipamentos *Mini-Protean II Tube Cell* (*Bio-Rad*) e *EC4000P Series 90 Programmable* (*Apparatus Corporation*). A 20µL de amostra a analisar adicionou-se 10µL de tampão de amostra [1%(p/v) Azul de Bromofenol (*Sigma B-6131*); 10%(v/v) Glicerol (87%, *Merck*); 715mM β-mercaptoetanol (*Merck*); 10%(p/v) SDS; 0,5M Tris-HCl; pH 6,8]. A mistura é homogeneizada e aquecida em água a 100°C, durante 10min, sendo de seguida centrifugada à temperatura ambiente a 13200g (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000) durante 2min. Os géis foram mergulhados em tampão de corrida [1,92M Glicina (*Sigma-Aldrich*); 1%(v/v) SDS; 0,25M Tris], tendo sido aplicado no primeiro poço do gel, 3µL de marcador de pesos moleculares (Consultar o **Anexo 7.3** (pág. 65)) e nos restantes poços necessários, 15µL de amostra. Por fim, aplicou-se uma corrente de 180V, 35mA e 15W, durante cerca de 50min. Quando finalizada a corrida, os géis foram corados o/n recorrendo a uma solução corante [10%(v/v) Ácido acético (*Riedel de Haen*); 2% Azul Coomassie R-250 (*Sigma*); 35%(v/v) Metanol (*Pronolab*)]. Depois de corados, o excesso da solução é removida utilizando uma solução descorante [7%(v/v) Ácido acético; 5%(v/v) Metanol] até as bandas proteicas serem observáveis no gel. A constituição dos géis encontra-se no **Anexo 7.4** (pág. 66).

2.2.3 / Western-Blot

O ensaio de *Western Blot* apenas foi utilizado numa tentativa de compreender a origem da proteína “contaminante” presente nos géis de SDS-PAGE, com cerca de 38 kDa. Inicialmente as proteínas presentes nas amostras são separadas através de eletroforese em gel SDS-PAGE, a 15%. De seguida, o gel, as membranas de nitrocelulose, e os papéis de filtro são colocados em tampão de transferência Tris-Glicina 1x [10x Tampão Tris-Glicina (*BioRad*); 20% Metanol (*Panreac*)]. As proteínas presentes no gel foram transferidas para as membranas de nitrocelulose através do sistema *Fastblot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Apparatus* (*Biometra*, B33/B34) e *EC4000P Series 90 Programmable* (*Apparatus Corporation*), a 180V, 200mA e 8W, durante 1h30min. Após o processo de transferência, as membranas de nitrocelulose foram incubadas durante 1h a 37°C com soro policlonal primário anti-arsm [1/400 soro policlonal; 0,4% Leite em pó (*Oxoid*)]. De seguida, lavou-se três vezes com o tampão PBS-Tween 1x em intervalos de 30s entre cada lavagem.

No passo seguinte, foram efetuados dois protocolos de *Western-Blot* diferentes:

- 1) Após incubação com soro policlonal primário e lavagem, a membrana foi incubada com o conjugado - anticorpo secundário anti-IgM anti-rato conjugada com a enzima fosfatase alcalina (A-7784, *Sigma Immuno Chemicals*) diluída 1:5000 em PBS-Tween 1x - durante 1h a 37°C. Seguidamente, a membrana foi lavada três vezes com tampão PBS-Tween 1x e uma vez com água *Milli-Q*.
- 2) No segundo protocolo utilizado, o objetivo era comprovar que o “contaminante” provinha de parte da *E. coli XJb(DE3)* utilizada no estudo. Após a incubação com o soro policlonal primário e respetivas lavagens, retirou-se com uma hansa de *herle* uma porção de crescimento bacteriano de *E. coli XJb(DE3)* não transformada. Acrescentou-se 100µL tampão de lise [10mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM KCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,5% CHAPS] e centrifugou-se a 13200xg (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000) durante 1min. De seguida, recolheu-se o sobrenadante, e aplicou-se 500µL de PBS-Tween 1x e 3µL de anticorpo secundário anti-IgM, incubando-se durante 15min a 37°C. Posteriormente, centrifugou-se a 13200g (*KUBOTA Centrifuges*, Modelo 4000) durante 5min. No final, recolheu-se 500µL do sobrenadante e juntou-se a PBS-Tween 1x com leite em pó a 0,5%. A mistura foi aplicada na membrana e deixou-se incubar durante 1h a 37°C. No final, lavou-se a membrana três vezes com tampão PBS-Tween 1x e uma vez com água *Milli-Q*.

No final, adicionou-se a ambas as membranas o substrato NBT/BCIP [1:5 em água *Milli-Q*; *Zymed*] e deixou-se incubar durante 1h a 37°C. Após incubação, é possível observar a presença de bandas coloridas. NBT/BCIP são soluções utilizadas para corar membranas marcadas com sondas com fosfatase alcalina. A combinação entre NBT (do inglês, *Nitro-blue tetrazolium chloride*) e BCIP (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine*) revela uma cor púrpura intensa em reação com a fosfatase alcalina. (ThermoFisher, 2015)

2.2.4 / Método do ácido bicinconínico (BCA)

Para determinar a concentração do antigénio rsm recorreu-se ao método de quantificação proteica BCA. O método foi realizado de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. (Sigma-Aldrich,

2015) A 50 partes da solução A (Ácido bicinconínico, *Sigma*) foi adicionada 1 parte da solução B (Sulfato de Cobre (II), 4%, *Sigma*). A mistura A+B é então distribuída em alíquotas de 1mL. Dessa mistura, 7 alíquotas de 1mL são destinadas à construção da reta de calibração - às quais se adicionou volumes crescentes de 0 a 24µL de BSA (do inglês, *Bovine serum albumine*; *Sigma-Aldrich*) a 1mg/mL. Para determinar a concentração de antigénio rsm, adicionou-se 10µL de cada amostra, em duplicado, por 1mL de mistura A+B. Seguiu-se um período de incubação de 30min a 37°C, após o qual se mediu a absorvância para o comprimento de onda de 562nm, num espectrofotómetro de UV-Vis (*Varian Cary*, modelo 50 versão 3.0), utilizando uma célula de quartzo. Através da reta de calibração foi possível calcular a concentração de antigénio rsm presente em cada amostra (Ver **Anexo 7.5** (pág. 67)).

2.3 | NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNP)

2.3.1 | Síntese química de nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNP) utilizadas durante o trabalho, foram sintetizadas de acordo com o método de Turkevich (Turkevich *et al.*, 1951) e posteriormente desenvolvido por Kimling (Kimling *et al.*, 2006), com ligeiras alterações (Baptista *et al.*, 2005). Este método baseia-se na redução de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) na presença de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇), que atua não só como agente redutor mas também como agente de revestimento (do inglês, *capping agent*), proporcionando uma estabilização electroestática às AuNP em solução. Antes de se iniciar o processo de síntese, todo o material a utilizar na síntese foi previamente imerso em *aqua regia* [1:3(v/v); Ácido Nítrico, HNO₃ (*Panreac*); Ácido Clorídrico, HCl (*Panreac*)] o/n, e no dia seguinte, rigorosamente lavado com água destilada e água *Milli-Q*, até se obter um pH entre 7-8. A água-régia permite eliminar possíveis vestígios de metais que se encontrem depositados no material de vidro a utilizar, podendo estes interferir com a síntese correta das AuNP, ao funcionarem como núcleos de cristalização. Num balão de fundo redondo de 250mL foram adicionados 100mL de água ultrapura *Milli-Q* e 69,2µL de ácido tetracloroáurico 1,45mM [HAuCl₄; Au(III) 30%(m/v) em HCl, 99,9% (*Sigma-Aldrich*)]. Para o procedimento foi adaptado um condensador ao balão de fundo redondo e a solução foi aquecida sob refluxo utilizando uma placa de aquecimento (*P Selecta*) com um adaptador metálico, sob agitação moderada. Quando a solução entrou em ebulição, adicionou-se 10mL de citrato de sódio tribásico dihidratado 38,8mM [C₆H₅Na₃O₇.2H₂O; 1%(m/v); 99% (*Sigma-Aldrich*)], mantendo-se a solução sob aquecimento e agitação durante 15min. Após este período, manteve-se a solução unicamente sob agitação durante 15min, deixando-se posteriormente a arrefecer à temperatura ambiente.

A solução de AuNP preparada foi caracterizada por espectroscopia de UV-Vis (*Varian Cary*, modelo 50 versão 3.0), e armazenada a 4°C, no escuro, para utilização em ensaios posteriores. As AuNP sintetizadas através deste método apresentam o pico máximo da banda de SPR a cerca de 520nm, característico de formas esféricas entre 10 e 20nm de diâmetro. (Zeng *et al.*, 2011)

2.3.2 | Caracterização de AuNP através de espectroscopia de UV-Vis

Para caracterizar o tamanho e concentração a que se encontram as AuNP sintetizadas, é utilizada a espectroscopia de UV-Vis. Os espectros foram obtidos através de um espectrofotómetro (*Varian*

Cary, modelo 50, versão 3.0), no intervalo de comprimento de onda de 300 a 900nm, com recurso a células de quartzo (*Hellma Analytics*). Através dos espectros obtidos a partir da leitura da absorvância das amostras é possível determinar o diâmetro e a concentração das AuNP obtidas, recorrendo ao método descrito por Haiss. O espectro de UV-Vis também pode dar informação sobre a estabilidade coloidal e alterações na banda de SPR após a funcionalização e conjugação. O método de Haiss relaciona o valor de absorvância máxima da banda de SPR (Abs_{SPR}) da solução coloidal de AuNP para o comprimento de onda de 450nm (Abs_{450}), como demonstrado na **Equação 2. 1**. (Haiss *et al.*, 2007)

$$y = \frac{Abs_{SPR}}{Abs_{450\text{ nm}}} \quad \text{Equação 2. 1}$$

O valor resultante é utilizado para estimar o diâmetro da AuNP substituindo o valor de y na **Equação 2. 2**.

$$y = 0,335 \ln x + 0,7301 \quad \text{Equação 2. 2}$$

Para cada diâmetro de AuNP corresponde um coeficiente de extinção molar tabelado para o comprimento de onda de 450nm ($\epsilon_{450\text{nm}}$ em $M^{-1}cm^{-1}$). Assim, através da Lei de *Lambert-Beer*, representada na **Equação 2. 3**, determinou-se a concentração das AuNP (c – Concentração (M); ϵ_{450} – Coeficiente de Extinção Molar a 450nm; b – comprimento do percurso ótico).

$$c = \frac{Abs_{450\text{nm}}}{\epsilon_{450\text{nm}} \times b} \quad \text{Equação 2. 3}$$

2.3.3 / Funcionalização de AuNP

De modo a alterar a superfície e natureza química das nanopartículas revestidas por citrato de sódio, testou-se a funcionalização das AuNP com MUA (ácido 11-mercaptoundecanóico) ou CALNN (pentapéptido *Cys-Ala-Leu-Asn-Asn*), com o intuito de aumentar a estabilidade coloidal das AuNP e proporcionar superfícies mais apropriadas para a futura conjugação com o antígeno rsm.

2.3.3.1 / Funcionalização: AuNP-MUA e AuNP-CALNN

Para a funcionalização de AuNP com MUA e CALNN, 0,7mL de solução de AuNP revestidas com citrato de sódio, a uma concentração de 7,9nM e diâmetro calculado entre 10 e 20nm, adicionou-se um volume de solução de MUA [MUA 10mM em etanol absoluto] e um volume de solução de CALNN 5mM, respetivamente, de modo a obter uma razão molar AuNP:MUA de 1:5000 e uma razão molar de AuNP:CALNN de 1:1000, deixando-se a incubar o/n à temperatura ambiente e no escuro. Após o tempo de incubação, a funcionalização das AuNP por estes agentes de revestimento, foi comprovada através de espectroscopia de UV-Vis (*Varian Cary*, modelo 50 versão 3.0), sendo idealmente observada um desvio da banda de SPR de $\approx 3/4\text{nm}$.

2.3.4 / Conjugação com Antígeno rsm

Após funcionalização, prossegue-se a conjugação das nanopartículas para a formação dos bionanoconjugados com o antígeno rsm. Neste trabalho, de modo a garantir uma adsorção eficaz do antígeno às AuNP, foram também testados componentes como o EDC/NHS [Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, *Sigma-Aldrich*; N-hidroxisuccinimida, *Fluka*] e BSA (*Sigma-Aldrich*). Para as preparações de bionanoconjugados utilizaram-se duas concentrações *stock* de antígeno

rsm, a 6,1mg/mL e 8,6mg/mL. Todos os bionanoconjugados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,3%, sendo a mobilidade eletroforética avaliada através da aplicação *eReuss* desenvolvida pelo professor Ludwig Kripphal do Departamento de Informática (Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa). Os géis apresentados são representativos de triplicados.

2.3.4.1 / Bionanoconjugados: AuNP-MUA-Antigénio e AuNP-CALNN-Antigénio

Para a formação dos bionanoconjugados compostos por AuNP-MUA-Antigénio e AuNP-CALNN-Antigénio, foram distribuídos 0,7mL de solução de AuNP ($\approx 8\text{nM}$) funcionalizadas com MUA (razão molar de MUA para AuNP de 5000) ou com CALNN (razão molar de CALNN para AuNP de 1000). Posteriormente, adicionou-se aos volumes de AuNP funcionalizadas com MUA ou CALNN, volumes calculados de antigénio com razões molares crescentes, de 0 a 1500. Deixou-se a incubar o/n a 4°C. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 12880g durante 10min (*Centurion Scientific K3 Series*, rotor BRK5424), de modo a concentrar os bionanoconjugados e remover o excesso de antigénio, recorrendo-se à eletroforese em gel de agarose a 0,3% para o estudo das amostras.

2.3.4.2 / Bionanoconjugados: AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio

Foram também testados bionanoconjugados compostos por AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio. Nestes, não se observa a formação de ligações electroestáticas entre o antigénio e a nanopartícula mas sim um efeito de reticulação química, com formação de ligações covalentes (*cross-link*), através dos componentes EDC e NHS. Distribuiu-se assim 0,7mL de solução de nanopartículas ($\approx 8\text{nM}$) funcionalizadas com MUA (razão molar de MUA para AuNP de 5000) sobre os quais foram testados diferentes concentrações de EDC/NHS [Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, *Sigma-Aldrich*; N-hidroxissuccinimida, *Fluka*] diluídos em água *Milli-Q*; tampão PBS 1x pH 7,4; tampão Fosfato de sódio pH 7,2 [5mM; Fosfato de sódio monobásico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; *Scharlau*) e Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4 ; *Sigma-Aldrich*) 1:1; pH 7,2], ou tampão MES pH 7 [10mM $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ (*Sigma-Aldrich*); pH 7]. Todos os tampões e respetivas concentrações de EDC/NHS testadas nos vários ensaios encontram-se descritos no **Anexo 7.6** (pág. 68). Em todos os casos estudados, incubou-se EDC/NHS durante 1h a 4°C. Posteriormente, adicionou-se ao volume de AuNP-MUA-EDC/NHS, volumes calculados de antigénio rsm com razões molares crescentes, de 0 a 1500, incubando-se o/n a 4°C. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 12880g durante 10min (*Centurion Scientific K3 Series*, rotor BRK5424), recorrendo-se por fim à eletroforese em gel de agarose a 0,3%.

2.3.4.3 / Bionanoconjugados: AuNP-MUA-BSA-Antigénio

Para a formação de complexos BSA-Antigénio, foram testadas razões molares crescentes de BSA para Antigénio, para uma melhor compreensão de qual a quantidade de BSA necessária para obter os bionanoconjugados com maior quantidade de antigénio e simultaneamente, mais estáveis. Assim, foram testadas razões molares crescentes de BSA [50mg/mL; *Sigma-Aldrich*] para Antigénio rsm purificado, de 0,1 a 1, deixando-se incubar a mistura durante 3h a 4°C, e, posteriormente diluindo cada amostra 20x em água *Milli-Q*. Para a formação dos bionanoconjugados compostos por AuNP-MUA-BSA-Antigénio, foram distribuídos 0,7mL de solução de AuNP ($\approx 8\text{nM}$) funcionalizadas com MUA

(razão molar de MUA para AuNP de 5000). Posteriormente adicionou-se ao volume de AuNP funcionalizadas com MUA, volumes calculados de BSA-Antigénio rsm com razões molares crescentes de 0 a 1500, deixando-se a incubar o/n a 4°C. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 12880g durante 10min (*Centurion Scientific K3 Series*, rotor BRK5424), de modo a concentrar os bionanoconjugados e remover o excesso de antigénio rsm e BSA, recorrendo-se por fim à eletroforese em gel de agarose a 0,3% para o estudo das amostras.

2.4 | LIGAÇÃO ANTIGÉNIO RSM – SORO POLICLONAL ANTI-ARSM

Após a seleção dos melhores bionanoconjugados, foi necessário testar a ligação antigénio-soro policlonal. O soro, utilizado neste ensaio, é um soro policlonal produzido através da imunização de murganhos Balb/C com o antigénio rsm, sendo constituído por anticorpos anti-arsm. Isolou-se o antigénio rsm diretamente de um gel SDS-PAGE a 15%, injetando-se de seguida nos murganhos Balb/C juntamente com adjuvante incompleto de Freud (*Sigma*). Para este ensaio, foram distribuídos 0,5mL de solução de AuNP ($\approx 8\text{nM}$) funcionalizadas com MUA (razão molar de MUA para AuNP de 5000) e conjugadas com BSA-Antigénio (razão molar de BSA para Antigénio de 0,75 e razão molar de Antigénio para AuNP de 300), originando os bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antigénio. Posteriormente, adicionou-se ao volume de bionanoconjugados, volumes calculados de soro policlonal (concentração *stock* de 96,3mg/mL) diluído 5x em água *Milli-Q* em razões molares crescentes de 0,1 a 1, tendo-se estudado 3 tempos de incubação: 1h, 2h e incubação o/n, a 4°C. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 12880g durante 15min (*Centurion Scientific K3 Series*, rotor BRK5424), de modo a concentrar os bionanoconjugados. Foi testada também a diferença entre amostras centrifugadas sem lavagem, ou com 1 ou 2 lavagens, com tampão fosfato de sódio pH 7,2 [5mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (*Scharlau*) e Na_2HPO_4 (*Sigma-Aldrich*) 1:1; pH 7,2], de modo a compreender qual permitiria a remoção do excesso de antigénio, BSA e anticorpo. Por fim, recorreu-se à eletroforese em gel de agarose a 0,3% para o estudo das amostras.

2.5 | ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 0,3%

A formação dos bionanoconjugados foi confirmada pela separação através de eletroforese em gel de agarose [Agarose, *Invitrogen*; 0,3% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1:8]. Após a preparação do tampão de corrida [TAE 1:8] e colocação na tina, o gel de agarose sólido foi imerso no tampão. As amostras foram centrifugadas a 4°C, durante 10min a 12880g (*Centurion Scientific K3 Series*, rotor BRK5424). Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuscitado em 13,5 μL de tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2 e 1,5 μL de glicerol (99,5%, *Sigma-Aldrich*) e aplicou-se 15 μL de amostra por poço. A separação eletroforética foi efetuada nos primeiros ensaios durante 30min a 180V e posteriormente reduziu-se para 15min a 180V, recorrendo aos equipamentos *Mini-Sub Cell GT Cell* (*Bio-Rad*) e *PowerPac Basic Power Supply* (*Bio-Rad*). A mobilidade eletroforética (μ em $\text{cm}^2/\text{V.s}$) foi determinada através da medição da distância de migração (cm) e de acordo com a **Equação 2. 4**, onde v representa a velocidade de migração (cm/s) e E , o campo elétrico (V/cm). (Zheng *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2007)

$$\mu = \frac{v}{E}$$

Equação 2. 4

3 | RESULTADOS

3.1 | EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DO ANTIGÊNIO RSM EM *E. COLI* XJB(DE3)

Para o estudo da expressão do antígeno rsm em *E. coli* XJb(DE3) foi necessário o isolamento de colônias de células transformadas, obtidas através da repicagem de placas de Petri inoculadas com células transformadas contendo o vetor de expressão *pLATE31*. (Coutinho, 2015) O procedimento encontra-se descrito na secção 2.1.1. Começou-se por inocular volumes crescentes de meio *LB Broth* com ampicilina (100µg/mL) a 37°C – de 4mL a 600mL, como referido na secção 2.1.1 - para obtenção de crescimento bacteriano exponencial. Posteriormente, procedeu-se à indução da expressão do antígeno rsm com IPTG (1mM), e, por fim, à adição de meio fresco com L-arabinose, para indução de fenótipo de autólise. As células foram centrifugadas e o sedimento ressuscitado em tampão de lise, processo este complementado com dois ciclos de congelação, a -20°C, e descongelação, à temperatura ambiente, que permitem que as células contraíam e quebrem durante a descongelação devido à formação de cristais de gelo. O sedimento do segundo ciclo de congelação e descongelação foi ressuscitado em ureia de modo a solubilizar os corpos de inclusão em que se insere o antígeno (secção 1.3). Terminado o processo, a amostra induzida e lizada (**E**) bem como os sobrenadantes dos ciclos de congelação e descongelação (**1** e **2**), e o sedimento em ureia (**3**), foram analisados por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% (**FIGURA 3. 1**). Através do gel, observou-se na coluna **3** e **E**, a presença de uma banda de tamanho correspondente ao peso molecular do antígeno em estudo, de 16,7kDa, verificando-se também a ausência do antígeno nas amostras 1 e 2, comprovando a presença do antígeno nas frações insolúveis e a expressão em corpos de inclusão.

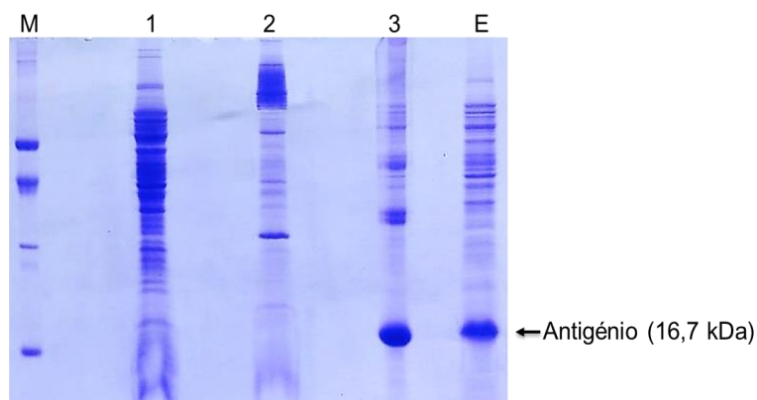


FIGURA 3. 1 | Gel de eletroforese SDS-PAGE a 15%. M. Marcador de pesos moleculares; **1.** Sobrenadante (1º ciclo); **2.** Sobrenadante (2º ciclo); **3.** Sedimento ressuscitado com ureia; **E.** Extrato inicial após tampão de lise.

3.2 | PURIFICAÇÃO DO ANTIGÊNIO RSM ATRAVÉS DE IMAC

A purificação do antígeno rsm foi efetuada através de cromatografia de afinidade IMAC onde se utilizou uma coluna de 1mL *HiTrap* contendo resina *IMAC Sepharose 6 Fast Flow* (*GE Healthcare*) com iões Cu^{2+} imobilizados. A purificação foi efetuada com recurso a três tampões - tampão de lavagem, de ligação e de eluição (secção 2.1.2) – sendo os produtos gerados continuamente através da recolha de frações de 1mL - e o volume obtido a partir de cada fração avaliado por ELISA (medição a 405nm) e *Nanodrop ND-1000* da *Thermo Scientific*[®] (medição a 280nm) para avaliação

dos conteúdos proteicos. Começou-se por avaliar o tampão fosfato de sódio pH 7,4, como tampão de ligação, lavagem e eluição na purificação de antígeno rsm. A **FIGURA 3. 2**, demonstra os resultados obtidos aquando avaliação das frações obtidas por IMAC. Como se pode observar há um aumento significativo da absorvância a 280nm, nas frações relativas à fase de tampão de eluição, indicando a eluição de proteína e confirmando a presença do antígeno rsm através do aumento dos valores de absorvância a 405nm (ELISA).

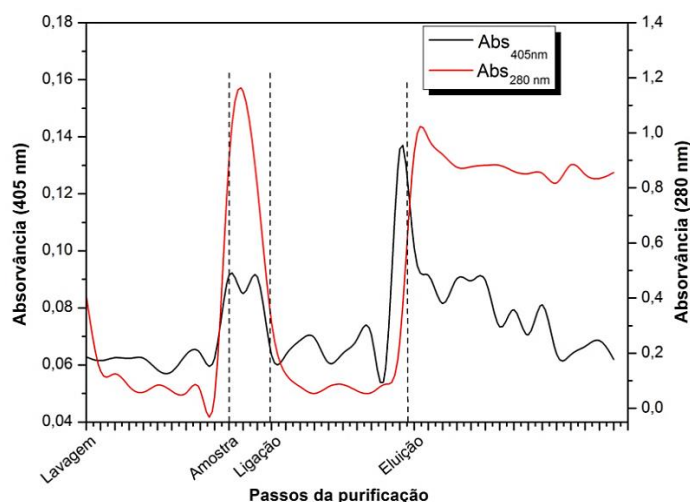


FIGURA 3. 2 | Purificação com tampão Fosfato de sódio pH 7,4. Representação dos valores de absorvância obtidos através de ELISA indireta (405nm – preto) e Nanodrop ND-1000 (280nm - vermelho).

Depois da purificação, a fração com maior absorvância detetada por ELISA, foi analisada por SDS-PAGE. A primeira fração da fase de tampão de eluição, correspondente à deteção de maior quantidade de antígeno por ELISA e traduzida em valores de absorvância elevada a 405nm, encontra-se representada na **FIGURA 3. 3**. Constatou-se a presença do antígeno, devido a uma banda intensa com peso molecular da proteína em estudo (16,7kDa), verificando-se também a presença de uma banda muito ténue, correspondente a uma proteína contaminante com peso molecular de 38kDa.

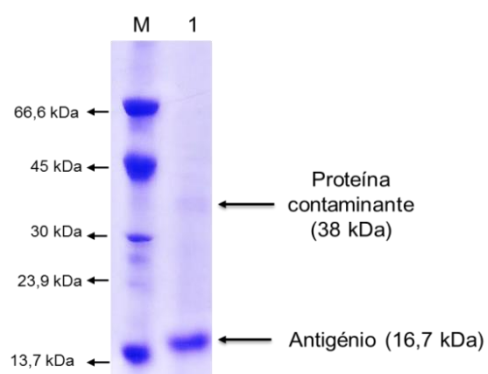


FIGURA 3. 3 | Gel de SDS-PAGE a 15%. Purificação com tampão de lavagem, ligação e eluição Fosfato de sódio pH 7,4 (M. Marcador de peso molecular; 1. 1ª fração de eluição).

3.3 | OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DO ANTIGÉNIO RSM ATRAVÉS DE IMAC

Após a primeira purificação com fosfato de sódio pH 7,4 e com o intuito de compreender qual o tampão que permite obter a maior quantidade de antígeno rsm purificado, foram testados mais 7 tampões (MES pH 6,0; MES pH 6,5; HEPES pH 7,5; HEPES pH 8,0; Tris-HCl pH 8,0; Tris-HCl pH 8,0; Bicarbonato de sódio pH 8,5), para posteriormente se proceder à formação dos bionanoconjugados com nanopartículas de ouro. Os resultados obtidos encontram-se descritos de seguida. Todos os ensaios foram efetuados em duplicado.

3.3.1 | 1º Ensaio: Comparação entre 8 tampões

Este primeiro ensaio de otimização teve como objetivo a comparação por ELISA e eletroforese em gel SDS-PAGE a 15% das frações obtidas pela purificação com diferentes tampões, inclusivamente com o tampão fosfato de sódio pH 7,4 testado anteriormente. No total, foram purificadas oito amostras de 2mL (sedimento ressuscitado em ureia) através de uma resina IMAC com iões Cu^{2+} e com recurso aos respetivos tampões de lavagem, ligação e eluição, como descrito no **Anexo 7.2** (pág. 62). As frações obtidas após purificação foram analisadas por ELISA (**FIGURA 3. 4**).

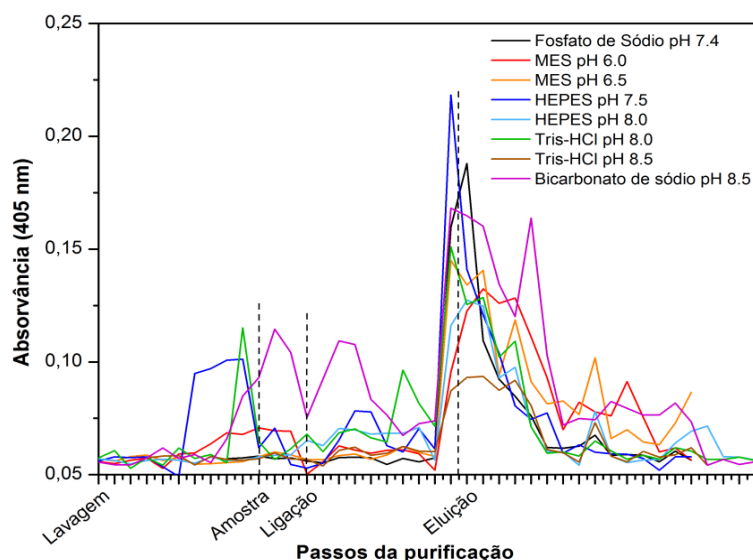


FIGURA 3. 4 | Comparação entre 8 tampões. Gráfico representativo dos valores de absorvância a 405nm, provenientes dos ensaios ELISA resultantes da análise das frações da purificação por IMAC.

De acordo com a **FIGURA 3. 4**, observou-se um aumento de absorvância, a 405nm, no ensaio de ELISA, entre a última fração de tampão de ligação e as frações eluídas pelo tampão de eluição, indicando a presença do antígeno rsm. Os resultados de ELISA apresentam, no entanto, nas frações da fase de tampão de ligação, valores de absorvância elevadas, significando que parte do volume de amostras aplicado não se ligou devidamente à coluna – principalmente observado para o tampão Bicarbonato de sódio pH 8,5.

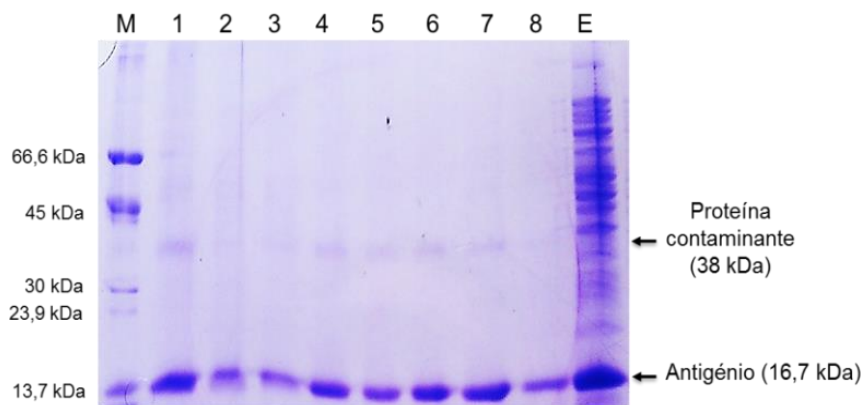


FIGURA 3. 5 | Gel de SDS-PAGE a 15%. Comparação das frações de eluição, após purificação (M. Marcador de pesos moleculares; Tampão: 1. Fosfato de sódio pH 7,4; 2. MES pH 6,0; 3. MES pH 6,5; 4. HEPES pH 7,5; 5. HEPES pH 8,0; 6. Tris-HCl pH 8,0; 7. Tris-HCl pH 8,5; 8. Bicarbonato de sódio pH 8,5; E. Extrato inicial).

Terminados os ensaios de ELISA, retirou-se uma alíquota da primeira fração do passo de eluição, para testar por eletroforese em SDS-PAGE e analisar a presença do antígeno rsm. Os resultados representam-se na **FIGURA 3. 5**. A partir da análise do gel SDS-PAGE foi possível inferir a presença do antígeno rsm de 16,7kDa, em todas as amostras purificadas pelos diferentes tampões, permitindo comparar a intensidade das bandas proteicas geradas e a eficiência dos tampões na purificação. Através da **FIGURA 3. 5**, concluiu-se que os tampões MES pH 6,0 e pH 6,5 – devido às baixas bandas proteicas geradas –, bem como bicarbonato de sódio pH 8,5, não são ideais para a purificação de uma elevada quantidade de antígeno, no entanto, os tampões HEPES pH 7,5 e pH 8,0, Tris-HCl pH 8,0 e 8,5 permitem purificar a maior quantidade de antígeno rsm (através da comparação da densidade da banda do antígeno purificado), e, por isso, serão testados nos próximos ensaios. Apesar da fração purificada com o tampão fosfato de sódio pH 7,4 proporcionar uma quantidade equivalente de antígeno rsm purificado, apresenta uma maior quantidade de proteína contaminante tendo sido por isso descartado como tampão ideal para a purificação do antígeno.

3.3.2 | 2º Ensaio: Presença e ausência de glicerol

O segundo ensaio foi efetuado com o intuito de aumentar a solubilidade da proteína em estudo, de forma a obter um antígeno purificado numa forma mais estável em solução. Sujeitaram-se 8 amostras ao processo descrito na totalidade no **Anexo 7.2** (pág. 62), com os respetivos tampões de lavagem, ligação e eluição. A utilização de glicerol (5%) na constituição dos tampões de eluição teve como finalidade o aumento da solubilidade do antígeno rsm. Os tampões com diferentes valores de pH, utilizados e testados ao longo deste ensaio foram os considerados os mais eficientes no ensaio anterior ou seja, HEPES pH 7,5/pH 8,0, Tris-HCl pH 8,0/pH 8,5. As frações de 1mL obtidas em cada purificação foram avaliadas por ELISA (**FIGURA 3. 6**).

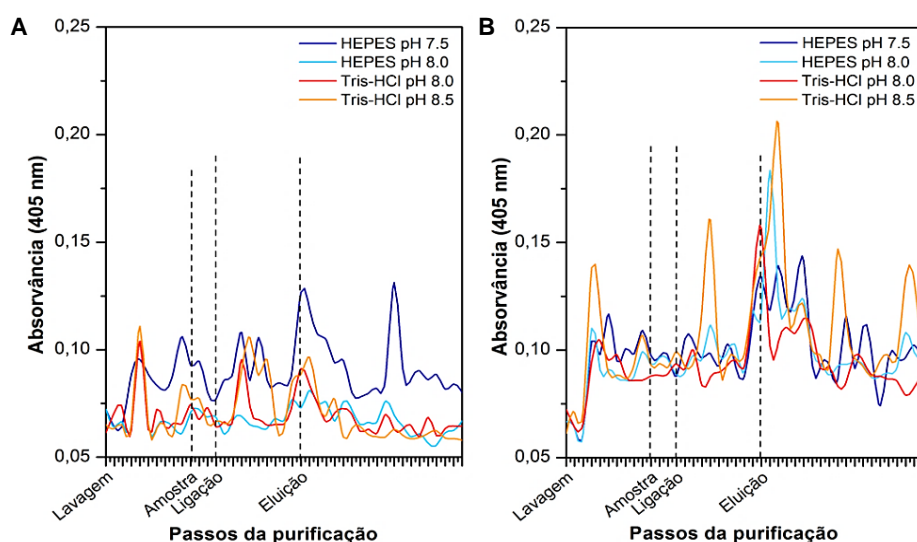


FIGURA 3. 6 | Purificação por IMAC. A. Presença e B. Ausência de glicerol. Representação dos resultados obtidos por ELISA indireta (405nm) e resultante da análise dos produtos da purificação.

De acordo com a **FIGURA 3. 6**, observam-se, na ausência de glicerol, espectros semelhantes aos observados nos ensaios anteriores e considerados como ideais no que toca a purificação com IMAC,

com o aumento dos valores medidos a 405nm após aplicação de tampão de eluição (com maiores valores na última fração da ligação e primeira fração de eluição), demonstrando a presença do antígeno rsm. No entanto, na presença de glicerol, não se observam estas distinções, indicativo de que não ocorreu ligação e posterior eluição da amostra. De modo a observar a presença do antígeno rsm, efetuou-se eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%. Os resultados encontram-se representados na **FIGURA 3. 7**. É possível observar a 1ª fração da lavagem, a 1ª fração da ligação e a 1ª fração de eluição. Através dos géis, confirmou-se a presença da banda de 16,7kDa, referente ao antígeno em estudo, e a banda de peso molecular de 38kDa, referente à proteína contaminante, sendo ambas mais notórias nos géis representativos de purificação com tampão de eluição sem glicerol na sua constituição, e coerentes com o aumento dos valores obtidos nos ensaios ELISA (**FIGURA 3. 6**).

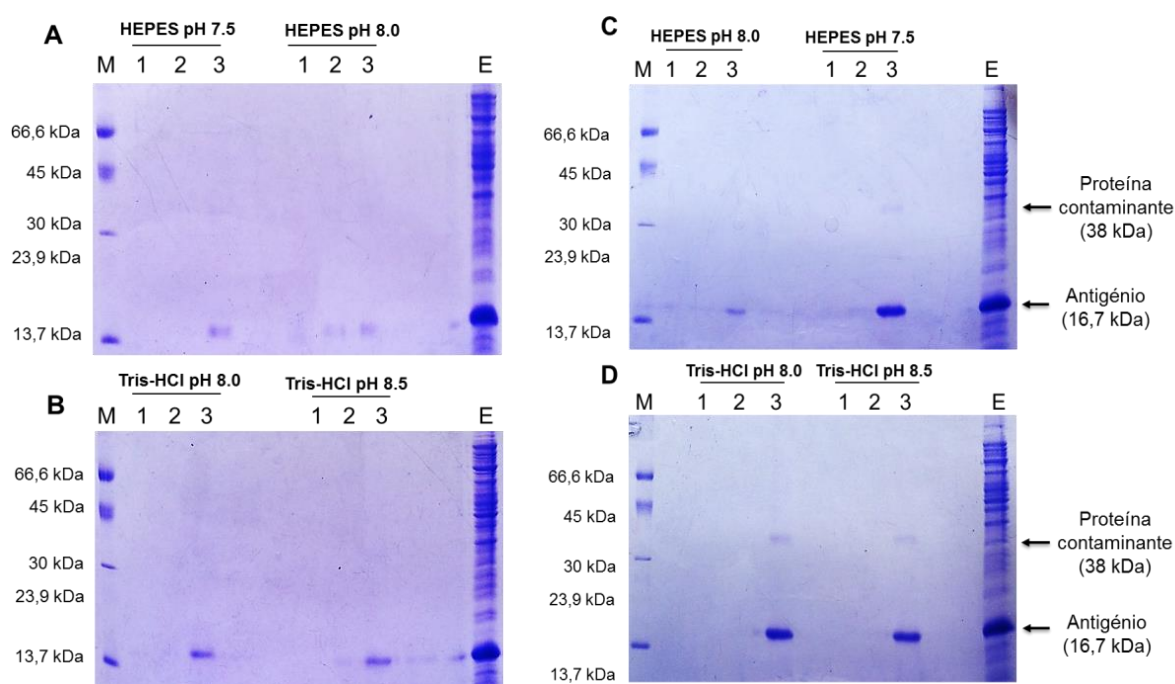


FIGURA 3. 7 | Gel em SDS-PAGE a 15%. Purificação com 5% glicerol. A/B. M. Marcador de pesos moleculares; Fração de: 1. Lavagem, 2. Ligação, 3. Eluição; E. Extrato inicial. **Purificação sem glicerol. C/D. M.** marcador de pesos moleculares; Fração de: 1. Lavagem, 2. Ligação, 3. Eluição; E. Extrato inicial.

Também é possível constatar a ausência da proteína nas frações de lavagem e ligação testadas, comprovando o funcionamento correto da purificação. Concluiu-se que o glicerol nos tampões de eluição não promove uma condição favorável à purificação do antígeno rsm. Quando comparadas as intensidades das bandas referentes ao antígeno rsm purificado com tampões sem glicerol (**FIGURA 3. 7C e D**) constatou-se a presença de bandas mais intensas para as amostras purificadas com Tris-HCl pH 8,0, relativamente às restantes.

3.3.3 / 3º e 4º Ensaio: Alteração do tampão de lavagem e de ligação

Para os presentes ensaios, sujeitou-se seis amostras (2mL) ao processo de purificação, descrito no **Anexo 7.2** (pág. 62). Este ensaio teve como intuito o teste de diferentes tampões de lavagem e ligação, de forma a compreender quais proporcionam uma melhor eliminação de proteínas com

ligações inespecíficas à resina e, por conseguinte, uma melhor purificação do antígeno em estudo. Com este ensaio pretendeu-se também eliminar a proteína contaminante de peso molecular 38 kDa, e presente regularmente nos géis. Foram testados os tampões de eluição mais eficientes: Tris-HCl pH 8,0 e HEPES pH 7,5; e quatro tampões de lavagem e ligação: Bicarbonato de sódio pH 8,5; Fosfato de sódio pH 7,4; Tris-HCl pH 8,0 ou HEPES pH 7,5. Após a purificação das amostras com as respetivas combinações, as frações de 1mL obtidas foram avaliadas por ELISA indireta e por eletroforese em gel de SDS-PAGE. Os resultados representam-se no **Anexo 7.7** (pág. 69), onde se observou variações na medição da absorvância (405nm), mantendo o aumento dos valores de absorvância para as frações referentes à lavagem da coluna com o tampão de eluição, revelando a eluição do antígeno rsm. Quanto aos resultados obtidos através de eletroforese, verificou-se a presença de duas bandas proteicas: uma banda de maior intensidade com 16,7kDa – referente ao antígeno rsm - e outra banda, de menor intensidade, com 38kDa – referente à proteína contaminante, até ao momento, de origem desconhecida. Com base nos resultados, foi possível concluir que as melhores combinações de tampões testadas são Tris-HCl pH 8,0 e HEPES pH 7,5, como tampão de lavagem, ligação e eluição.

3.3.4 / 5º Ensaio: HEPES pH 7,5 / Tris-HCl pH 8,0

No penúltimo ensaio, descrito no **Anexo 7.2** (pág. 62), purificou-se duas amostras de 2mL através de uma resina IMAC em coluna *HiTrap* (GE Healthcare) com iões Cu^{2+} imobilizados. Este ensaio teve como intuito observar as diferenças entre os tampões considerados como ideais até ao momento (HEPES pH 7,5/Tris-HCl pH 8,0). Após a purificação das amostras, as respetivas frações de 1mL foram submetidas ao método de ELISA indireto, e, de seguida, a fração de eluição em que se obteve maiores valores de absorvância a 405nm foi avaliada por eletroforese em gel de SDS-PAGE.

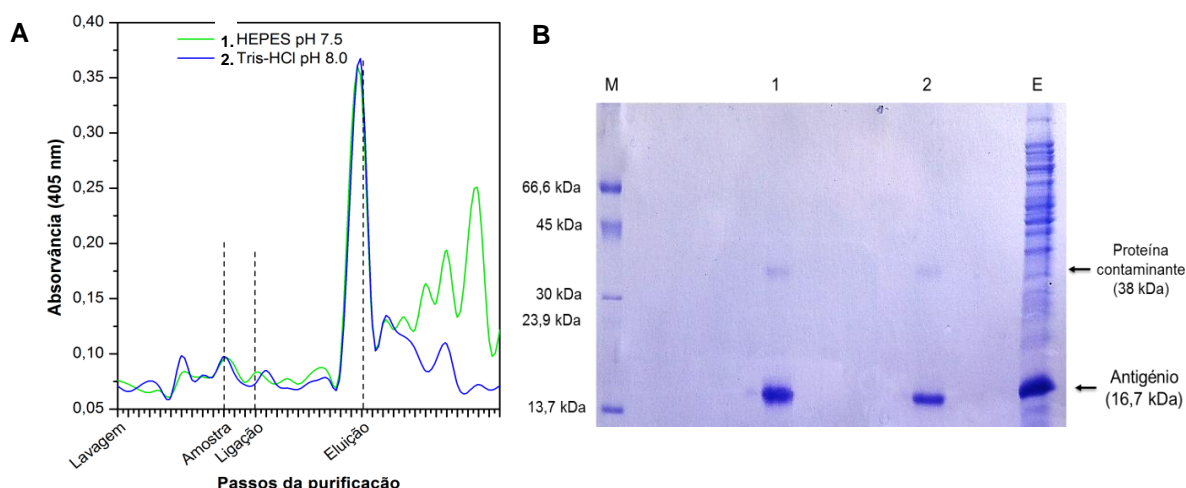


FIGURA 3. 8 | Purificação por IMAC: HEPES pH 7,5 e Tris-HCl pH 8,0. **A.** Representação dos resultados obtidos por ELISA indireta (405nm) através da análise dos produtos da purificação por IMAC. **B.** Gel de SDS-PAGE a 15%. Purificação com Tris-HCl pH 8,0/HEPES pH 7,5. (**M.** Marcador de pesos moleculares; **1.** Eluição com Tris-HCl pH 8,0; **2.** Eluição com HEPES pH 7,5; **E.** Extrato inicial).

Os resultados encontram-se na **FIGURA 3. 8**. Para as purificações efetuadas foi possível observar o aumento dos valores medidos a 405nm entre a última fração de ligação e ao longo das frações de

eluição, indicativo de que o antígeno rsm foi purificado com sucesso, observando-se também que para o tampão HEPES pH 7,5, a eluição do antígeno não é efetuada de forma constante. No gel de SDS-PAGE, verificou-se a presença da proteína em estudo, com o peso molecular característico de 16,7kDa, bem como a proteína contaminante de 38kDa, concluindo-se que o melhor tampão de lavagem, ligação e eluição é o tampão Tris-HCl pH 8,0 pois permite a obtenção de uma banda de intensidade mais elevada quando em comparação com o tampão HEPES pH 7,5.

3.3.5 / 6º Ensaio: Antígeno rsm para conjugação com AuNP

Os ensaios anteriores permitiram o desenvolvimento de um protocolo otimizado para a purificação do antígeno rsm. Por último e de modo a produzir proteína purificada para prosseguir com os ensaios de conjugação com as AuNP, foram purificadas, dez amostras (seis de 6mL e quatro de 2mL) com 10mL tampão de lavagem e ligação Tris-HCl pH 8,0 [20mM Tris-HCl; 500mM NaCl; 20mM Imidazole; pH 8,0] e 20mL tampão de eluição Tris-HCl pH 8,0 [20mM Tris-HCl; 500mM NaCl; 500mM Imidazole; pH 8,0], encontrando-se o procedimento descrito no **Anexo 7.2** (pág. 62). Após purificação, os volumes de cada fração foram avaliados por ELISA – **Anexo 7.8** (pág. 69). Através da análise dos resultados, constatou-se o aumento da absorvância nas frações relativas ao passo da eluição do antígeno, indicativo de uma purificação bem-sucedida e eluição do antígeno pelo tampão de eluição, observando-se resultados semelhantes em todas as purificações. Posteriormente foi efetuada eletroforese em gel de SDS-PAGE, onde se avaliou a 1ª fração de eluição de todas as purificações realizadas – ver **FIGURA 3. 9**.

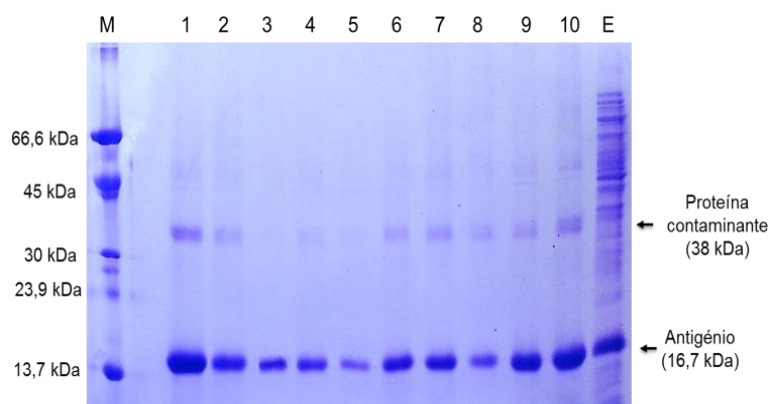


FIGURA 3. 9 | Gel de SDS-PAGE a 15%. Purificação com Tampão de lavagem, ligação e eluição Tris-HCl pH 8,0. (M. Marcador de pesos moleculares; 1 a 10. Amostra final purificada; E. Extrato inicial).

Analisando o gel representado foi possível constatar a presença do antígeno rsm de forma reprodutível em todas as frações avaliadas, contudo com a igual presença da proteína contaminante. Inferiu-se também que quanto maior a quantidade de antígeno presente na amostra, maior a quantidade de proteína contaminante – sempre em menor quantidade comparativamente com o antígeno em estudo. Deste modo, para cada purificação, juntaram-se as primeiras oito frações do passo de aplicação de tampão de eluição de cada purificação, que foram, de seguida, armazenados a 4°C. De entre os volumes armazenados, foram escolhidas as seis primeiras purificações (aleatoriamente) para a formação dos bionanoconjugados, tendo-se dividido em dois grupos a dialisar – alterando-se o tampão para [10mM Tris-HCl, 20mM NaCl, 2% glicerol, pH 8,0]. Na **FIGURA 3. 10A**

encontra-se o gel de SDS-PAGE com os diferentes volumes de cada purificação armazenada, sendo possível observar a banda referente ao antígeno rsm em estudo e na **FIGURA 3. 10B**, o resultado das duas diálises. Pelo método de BCA, verificou-se que o antígeno rsm se apresenta após diálises com uma concentração de 6,1mg/mL e 8,5mg/mL. A reta de calibração bem como as concentrações da proteína armazenada, encontram-se no **Anexo 7.5** (pág. 67). Através de *Western-blot* foi possível identificar a origem do contaminante (**Anexo 7.9** – pág. 70) – argumenta-se que seja proveniente de *E. coli* XJb(DE3) -, no entanto, é necessário efetuar mais estudos.

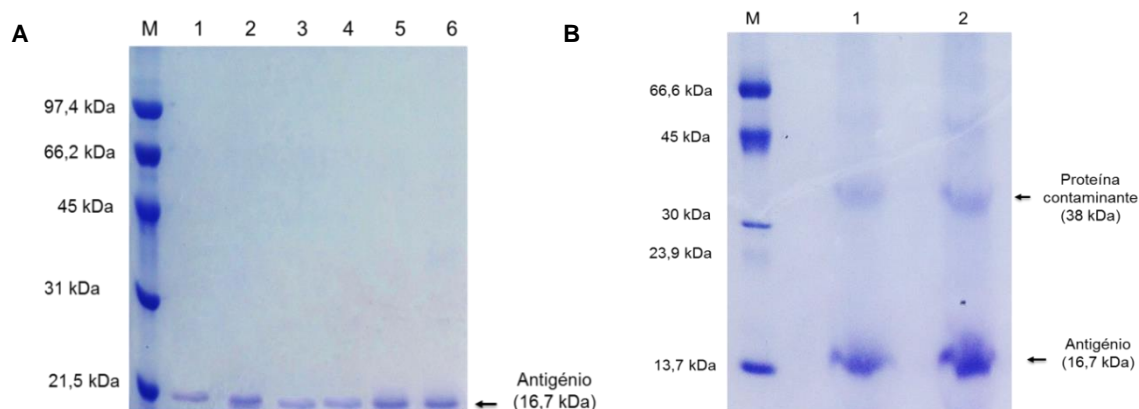


FIGURA 3. 10 | Gel de SDS-PAGE 15%. A. Purificação com Tampão Tris-HCl pH 8,0. (**M** - Marcador de pesos moleculares – *Low Range Molecular Weight Standard Bio-Rad*; **1 – 6**: Amostra final purificada. **B.** Resultado das diálises: **M**. Marcador de pesos moleculares; **1**. 1ª diálise; **2**. 2ª diálise.

3.4 / SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNP foram sintetizadas de acordo com o método de Turkevich, posteriormente desenvolvido por Kimling. (Kimling *et al.*, 2006; Turkevich *et al.*, 1951) Este é um método que apresenta geralmente elevada reprodutibilidade, possibilitando a síntese de AuNP com concentrações e diâmetros reprodutíveis. Durante todo o processo de síntese foram observadas mudanças de cor na solução de AuNP, características da formação de AuNP com o diâmetro pretendido, ou seja, entre 15-20nm (**FIGURA 3. 11A**). A solução de sal de ouro apresenta originalmente uma cor amarela, proveniente dos complexos de ouro, que após adição do agente redutor – citrato de sódio – passa a incolor, devido à redução do sal de ouro. Posteriormente, os núcleos de sal de ouro dissociam-se e os núcleos de ouro originados são revestidos e estabilizados pelos iões de citrato, uma vez que estes se encontram em excesso. Com um tamanho muito reduzido, os núcleos revestidos apresentam uma cor muito escura, quase preta, e à medida que vão crescendo, a banda de SPR desloca-se para comprimentos de onda maiores, até estabilizarem a cerca de 15-20nm, apresentando uma cor avermelhada. Após a síntese, as AuNP encontram-se revestidas com iões de citrato, apresentando-se electrostaticamente estáveis, sendo necessário avaliar a concentração e diâmetro das AuNP sintetizadas através de caracterização por espectroscopia de UV-Vis. Na **FIGURA 3. 11B** encontra-se o espectro de UV-Vis representativo obtido. Por último, calculou-se o índice de agregação das AuNP, através do quociente entre a absorvância característica do estado agregado – medida a 600nm – e a absorvância do pico máximo da banda de SPR. O índice de agregação de 0,19 é indicativo de uma solução de AuNP em boas condições.

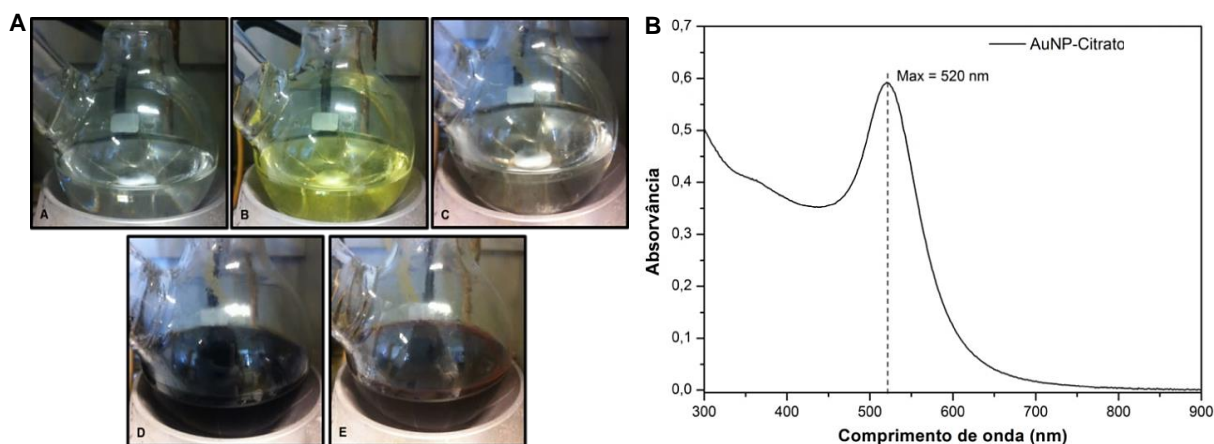


FIGURA 3. 11 | Síntese de nanopartículas de ouro. A. Água *Milli-Q* (A); Adição da solução de ácido tetracloreáurico (B); após adição de citrato (C), (D); e no final da reação (E). B. Espectro de UV-Vis de AuNP, após síntese, que permitiu determinar o diâmetro médio e a concentração da solução de AuNP.

O diâmetro e concentração das AuNP sintetizadas foram calculados pelo método de Haiss, tal como descrito na secção 2.3.2, e seguindo as equações **Equação 2. 1**, **Equação 2. 2** e **Equação 2. 3**. (Haiss *et al.*, 2007) Primeiro foi necessário calcular o rácio entre a absorvância do pico máximo da SPR (520nm) e a absorvância para 450nm, como se pode observar na **Equação 3. 1**.

$$y = \frac{\text{Abs}_{\text{SPR}}}{\text{Abs}_{450 \text{ nm}}} = \frac{0,5925}{0,3554} = 1,667 \quad \text{Equação 3. 1}$$

Substituindo o valor de y na **Equação 2. 2**, verifica-se que as AuNP sintetizadas apresentam um diâmetro médio de 16nm. Este diâmetro corresponde a um valor de $\epsilon_{450\text{nm}}$ tabelado, que permite o cálculo da concentração de AuNP através da **Equação 2. 3**, tendo em conta o fator de diluição (1:6) utilizado na caracterização por espectroscopia de UV-Vis, concluindo-se que o volume de AuNP sintetizadas apresenta uma concentração de 7,9nM.

3.5 | FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

3.5.1 | Funcionalização com MUA ou CALNN

Após a síntese, seguiu-se a funcionalização das AuNP. Com o intuito de aumentar a estabilidade coloidal das AuNP e a substituição do citrato, estudou-se a funcionalização das AuNP com MUA e CALNN de modo a compreender qual confere maior estabilidade às nanopartículas, testando posteriormente a sua capacidade de formação de bionanoconjugados estáveis com o antígeno rsm em estudo. As AuNP foram incubadas com MUA e CALNN, nas seguintes razões molares: AuNP:MUA (1:5000) e AuNP:CALNN (1:1000). No final da incubação, a funcionalização foi comprovada através de espectroscopia de UV-Vis, pela análise do desvio do pico máximo da banda de SPR entre as AuNP-Citrato (não funcionalizadas) e as AuNP-MUA/AuNP-CALNN. Os resultados encontram-se na **FIGURA 3. 12**. Ambas as funcionalizações foram comprovadas por espectroscopia de UV-Vis pela observação do deslocamento dos máximos da banda de SPR para comprimentos de onda maiores em comparação com o observado nas AuNP não funcionalizadas. As AuNP funcionalizadas com MUA apresentam um deslocamento de 4nm (máximo da banda a 524nm)

enquanto as AuNP funcionalizadas com CALNN apresentaram um deslocamento de 3nm, com um desvio da banda de SPR para 523nm, em comparação com AuNP-Citrato. Estes desvios são pouco maiores que o erro de medição do espectrofotômetro (± 2 nm), contudo, são consistentes entre amostras, funcionando como prova de funcionalização.

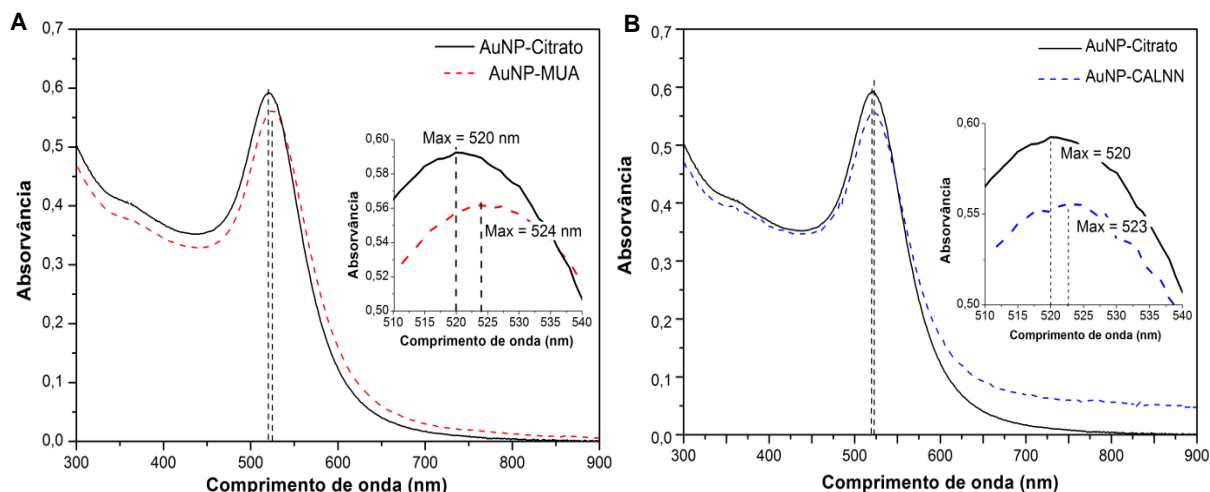


FIGURA 3. 12 | Funcionalização – AuNP-MUA e AuNP-CALNN. A. Espectros UV-Vis de AuNP não funcionalizadas (AuNP-Citrato) e AuNP funcionalizadas com MUA (1:5000). B. Espectros UV-Vis de AuNP não funcionalizadas (AuNP-Citrato) e AuNP funcionalizadas com CALNN (1:1000)

3.6 | CONJUGAÇÃO DE AuNP COM ANTIGÊNIO RSM

Após funcionalização das AuNP, prosseguiu-se com a conjugação com o antígeno rsm em estudo. Para além da conjugação direta com o antígeno testou-se a ligação com o auxílio de dois componentes: EDC/NHS, agentes de reticulação, e BSA, proteína usada regularmente como bloqueante de grupos livres após conjugação e que neste estudo será utilizada como estabilizador da ligação entre o antígeno e AuNP. Na presente dissertação, foram testados os seguintes bionanoconjugados: AuNP-MUA-Antígeno; AuNP-CALNN-Antígeno; AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno e AuNP-MUA-BSA-Antígeno. Por eletroforese em gel de agarose a 0,3% foi possível inferir qual o ligando mais adequado à formação de bionanoconjugados estáveis, bem como a razão molar de antígeno ideal à conjugação; através da aplicação informática *eReuss*, calculou-se a mobilidade eletroforética (μ) a partir de registos fotográficos dos géis, usando as distâncias de migração em função do tempo de corrida e a voltagem aplicada à experiência de eletroforese.

3.6.1 | Bionanoconjugados: AuNP-MUA-Antígeno / AuNP-CALNN-Antígeno

Para a formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno rsm foram testadas diferentes razões molares, de 0 a 1500 (razão molar de [Antígeno]/[AuNP-MUA]). Após a incubação o/n a 4°C, centrifugou-se os bionanoconjugados e avaliou-se o sedimento resultante, ressuspendido em tampão Fosfato de sódio 5mM pH 7,2, através de eletroforese em gel de agarose a 0,3% (**FIGURA 3. 13**). A **FIGURA 3. 13A** demonstra a mobilidade eletroforética de cada solução de bionanoconjugados por razão molar. Observou-se algum arrastamento, proporcional ao aumento da razão de antígeno rsm, em comparação com o ponto 0 – representativo de AuNP-MUA. Apesar da ausência de agregados nos poços, não se verificou a diminuição crescente da distância de migração, algo esperado com o

aumento da razão molar de antígeno. A mobilidade eletroforética foi também avaliada através da aplicação *eReuss* (FIGURA 3. 13B), sendo os resultados coincidentes com os da FIGURA 3. 13A.

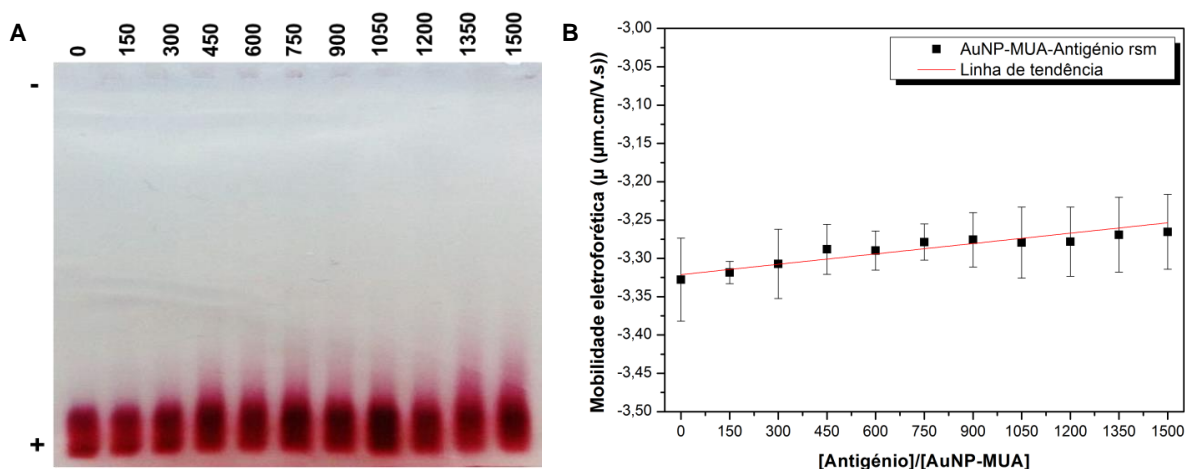


FIGURA 3. 13 | A. Eletroforese em gel de agarose a 0.3%. Bionanoconjugados AuNP-MUA-Antígeno, testados com razões molares [Antígeno]/[AuNP-MUA] desde 0 a 1500 Ânodo (-)/Cátodo (+) B. Mobilidade eletroforética (μ) avaliada através da aplicação informática *eReuss*. Representação de linha de tendência (vermelho). Desvio padrão representativo de triplicados.

Apesar dos resultados obtidos, efetuou-se espectroscopia de UV-Vis (FIGURA 3. 14) para comparação do deslocamento do máximo da banda de SPR entre AuNP-Citrato; AuNP-MUA e AuNP-MUA-Antígeno. Na FIGURA 3. 14, observou-se um deslocamento de 9nm do pico máximo de absorvância da SPR em relação às AuNP-Citrato, e de 5nm em relação às AuNP-MUA, comprovando a presença de antígeno rsm conjugado às AuNP. O índice de agregação de AuNP-MUA-Antígeno de 0,25 revelou um bom estado de solução sem elevada quantidade de agregados, em comparação com 0,19, observado para AuNP-Citrato.

O desvio da banda de SPR numa solução sem sinais de agregação pode corresponder a uma funcionalização/conjugação bem-sucedida, no entanto, não é um valor determinante, podendo corresponder igualmente a agregação, sendo por isso necessária a confirmação da funcionalização/conjugação por eletroforese em gel de agarose.

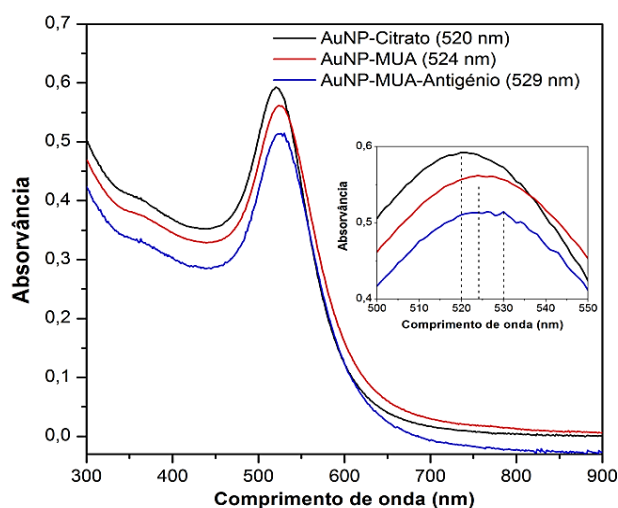


FIGURA 3. 14 | Espectroscopia de UV-Vis. Espectros obtidos para AuNP-Citrato (preto); AuNP-MUA (vermelho) e AuNP-MUA-Antígeno (azul), com os respetivos máximos da banda de SPR.

Os *bionanoconjugados AuNP-CALNN-Antígeno rsm* foram desenvolvidos através da conjugação de antígeno rsm a AuNP funcionalizadas com CALNN. Diferentes razões molares de antígeno rsm, desde 0 a 1500, foram conjugadas com AuNP-CALNN. Após concentração por centrifugação, os bionanoconjugados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose e a mobilidade eletroforética foi estudada através da aplicação *eReuss*. Os resultados encontram-se na FIGURA 3. 15.

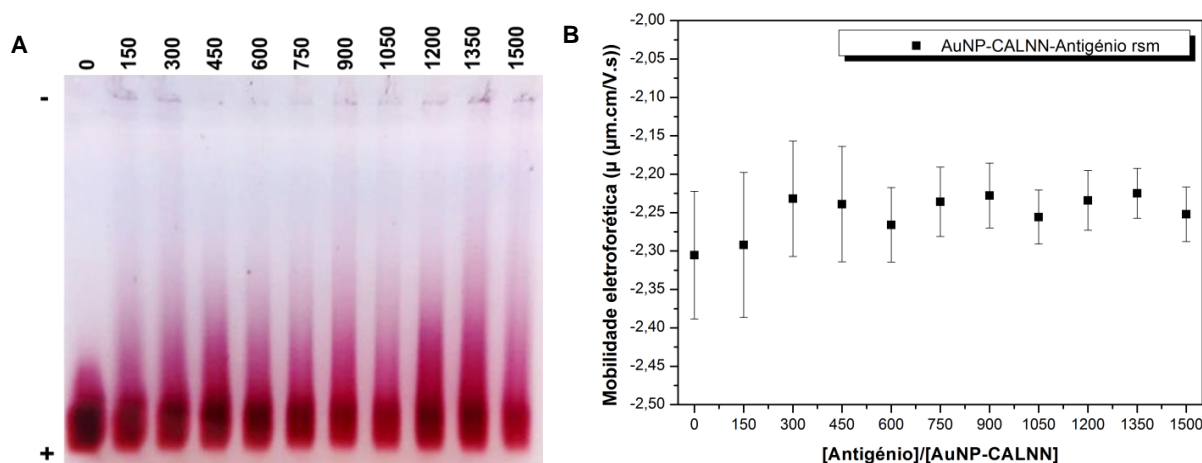


FIGURA 3. 15 | A. Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados AuNP-CALNN-Antigénio, testados com razões molares [Antigénio]/[AuNP-CALNN] de 0 a 1500. Ânodo (-)/Cátodo (+) **B.** Mobilidade eletroforética (μ) avaliada através da aplicação *eReuss*. Desvio padrão representativo de triplicados.

Apesar de não se observar a presença de agregação de AuNP nos poços do gel, observa-se maior arrastamento, em todas as razões molares estudadas, em comparação com os bionanoconjugados AuNP-MUA-Antigénio, comprovando uma taxa de agregação acrescida. A **FIGURA 3. 15B** representa os valores obtidos através da aplicação *eReuss*, não sendo possível a observação do estabelecimento de um patamar na mobilidade eletroforética para as diferentes razões molares [Antigénio]/[AuNP-CALNN] estudadas, sendo as variações entre a mobilidade das diferentes bandas não significativas e dentro do erro experimental. Por fim, as amostras foram testadas por espectroscopia de UV-Vis (**FIGURA 3. 16**). Os bionanoconjugados apresentam uma diferença de 8nm do máximo de absorvância da banda de SPR em relação a AuNP-Citrato, e de 5nm em relação a AuNP-CALNN, assim como um índice de agregação de 0,35 para AuNP-CALNN-Antigénio, em comparação com 0,29 de AuNP-CALNN e 0,19 de AuNP-Citrato.

A ausência de formação de patamar com o aumento das razões de antigénio aplicadas, bem como a verificação de arrastamento durante a corrida (podendo significar grupos de bionanoconjugados com diferentes quantidades de antigénio acoplado) bem como as diferenças no índice de agregação, excluem CALNN como ligando para a formação de bionanoconjugados estáveis.

3.6.2 | Bionanoconjugados: AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio

Para a formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigénio rsm, testaram-se quatro concentrações de EDC e NHS para quatro tampões diferentes, tal como descrito no **Anexo 7.6**.

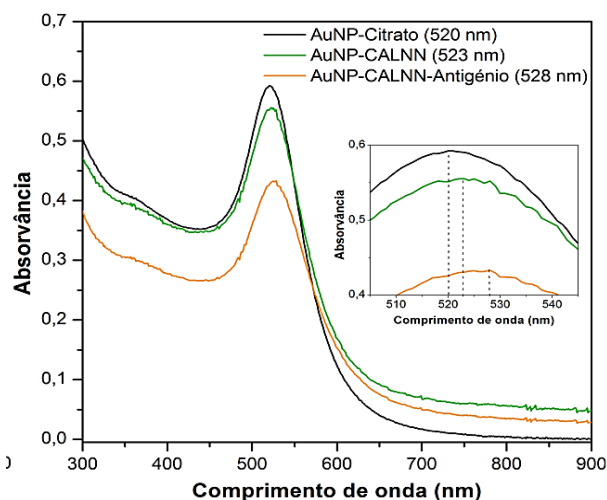


FIGURA 3. 16 | Espectroscopia de UV-Vis. Espectros obtidos para AuNP-Citrato (preto); AuNP-CALNN (verde) e AuNP-CALNN-Antigénio (laranja), com os máximos da banda de SPR.

Nestes ensaios, incubou-se EDC/NHS nas respetivas concentrações e tampões, com soluções de AuNP funcionalizadas com MUA, durante 1h a 4°C. Por fim, adicionou-se as diferentes razões molares [Antigénio]/[AuNP-MUA-EDC/NHS] de 0 a 1500 e avaliou-se, por espectroscopia de UV-Vis, os bionanoconjugados correspondentes à razão molar de 300 ([Antigénio]/[AuNP-MUA-EDC/NHS]), de modo a compreender qual o tampão e concentração de EDC/NHS origina uma ligação otimizada entre antigénio e AuNP-MUA. Considerando os índices de agregação para todos os casos estudados, determinou-se que as melhores condições a estudar (**FIGURA I. 8; Anexo 7.10 (pág. 70)**), tendo-se efetuado eletroforese em gel de agarose são: 0,2mM EDC/0,8mM NHS em PBS; 1 mM EDC/1mM NHS em MES; 0,2mM EDC/0,2mM NHS em Água Milli-Q e 0,4mM EDC/0,8mM NHS em Tampão Fosfato (PB). As restantes concentrações foram excluídas devido à observação de alteração da cor das AuNP e de agregados a olho nu, tendo também em conta o índice de agregação de cada uma das condições. Como resultado observou-se a mobilidade dos bionanoconjugados referidos, com formação de bandas bem definidas e redução do arrastamento observados nos géis com AuNP-MUA-Antigénio e AuNP-CALNN-Antigénio. No entanto, apesar da observação de uma migração ligeiramente maior da banda correspondente à razão molar de 0, não é possível concluir a olho nu, qual a razão molar [Antigénio]/[AuNP-MUA-EDC/NHS] que permite o revestimento das AuNP. Para tal, analisou-se os géis obtidos através da aplicação *eReuss*. No **Anexo 7.10** encontram-se os resultados obtidos, bem como os géis de agarose (**FIGURA I. 9**) e análise resultante da aplicação *eReuss* (**FIGURA I. 10**). Verificou-se a diminuição da mobilidade com o aumento da razão molar, no entanto, esta diminuição não surgiu numa tendência e com diferenças demasiado pequenas para se considerar como resultado da conjugação e do aumento da razão de antigénio presente à superfície da AuNP, excluindo-se assim a utilização da metodologia de reticulação química recorrendo a EDC/NHS, como adequada para a obtenção de bionanoconjugados estáveis.

3.6.3 / **Bionanoconjugados: AuNP-MUA-BSA-Antigénio**

Para a formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antigénio foram testados dois grupos de razões molares: (1) razões molares de [BSA-Antigénio]/[AuNP-MUA] de 0 a 1500, calculadas com base na concentração de antigénio; e (2) razões molares de [BSA]/[Antigénio] desde 0,1 a 1. A conjugação prévia do antigénio com BSA antes da sua ligação às AuNP-MUA teve o intuito de observar a capacidade da proteína BSA como molécula inerte estabilizadora e potenciadora da formação de BNC estáveis e robustos. Incubaram-se volumes de antigénio rsm com razões molares crescentes de BSA e AuNP com razões crescentes desta mistura BSA-Antigénio que foram posteriormente avaliados por eletroforese em gel de agarose. Os géis resultantes e a análise das suas mobilidades eletroforéticas encontram-se no **Anexo 7.11 (pág. 72)**. Testou-se cinco razões molares de antigénio por BSA para cada razão molar de antigénio por AuNP (150 a 600) – ver **FIGURA I. 12 (Anexo 7.11)**. A partir dos resultados obtidos inferiu-se que as razões molares de antigénio:BSA que permitem uma melhor conjugação do antigénio às AuNP são as razões molares de 1:0,75 e 1:1, repetindo-se os géis para estas razões molares – ver **FIGURA I. 13 (Anexo 7.11)**. Os resultados da eletroforese bem como a análise das suas mobilidades eletroforéticas, encontram-se no **Anexo 7.11**. Foi possível inferir que a razão de BSA para antigénio de 0,75, permite uma maior adsorção de antigénio à BSA – verificado através das diferenças constantes de mobilidade de 0,1

$\mu\text{m.cm/V.s}$, entre AuNP-MUA-BSA e AuNP-MUA-BSA-Antigénio. Para a razão molar de 1, observa-se uma maior mobilidade eletroforética para as AuNP-MUA-BSA em comparação com AuNP-MUA-BSA-Antigénio, demonstrando uma possível saturação das AuNP com BSA, tornando impossível inferir sobre a ligação do antigénio.

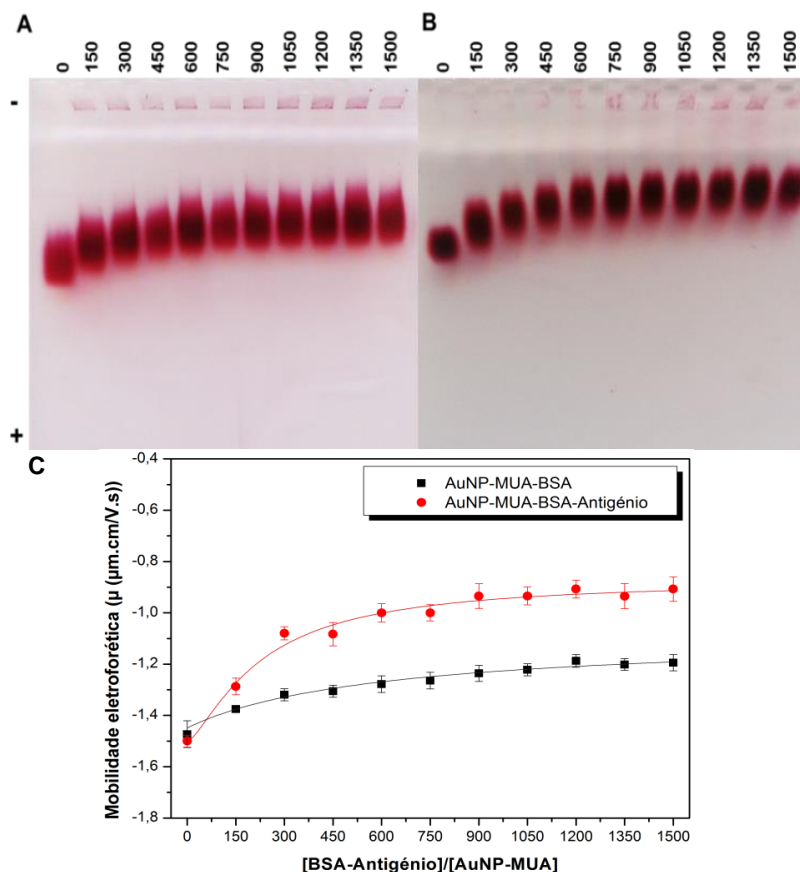


FIGURA 3. 17 | Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados com razão molar [BSA]/[Antigénio] de 0,75 e razões molares de [BSA-Antigénio]/[AuNP-MUA] de 0 a 1500. A. AuNP-MUA-BSA. **B.** AUNP-MUA-BSA-Antigénio. Ânodo (-)/Cátodo(+) **Mobilidade eletroforética (μ).** **C.** AuNP-MUA-BSA-Antigénio (vermelho) e AuNP-MUA-BSA (preto). Linhas a contínuo correspondentes ao ajuste dos dados experimentais à equação de *Langmuir*, com desvio padrão representativo de triplicados.

Efetuuou-se então uma eletroforese em gel de agarose, mantendo a razão molar de BSA por antigénio de 0,75, para compreender qual a razão molar de antigénio para AuNP à qual se obtém um patamar de mobilidade eletroforética (**FIGURA 3. 17**). A equação de *Langmuir*, que se ajustou aos dados experimentais, provém da equação de Hill, uma equação desenvolvida para descrever a capacidade de um ligando se ligar cooperativamente a um recetor, com a afinidade da ligação diretamente relacionada com a concentração de ligando presente. Através dos resultados da **FIGURA 3. 17**, verificou-se que a razão molar de 300 ([Antigénio-BSA]/[AuNP-MUA]) oferece um revestimento das AuNP com formação de coroa proteica, através da formação de patamar ($-1,1\mu\text{m.cm/V.s}$), permitindo a observação de diferenças de mobilidade ($\approx 0,2\mu\text{m.cm/V.s}$) entre AuNP-MUA-BSA e AuNP-MUA-BSA-Antigénio, confirmando o acoplamento de antigénio à BSA. Tendo em conta, os resultados observados, conclui-se o sucesso na formação de bionanoconjugados estáveis e robustos AuNP-MUA-BSA-Antigénio rsm com razões molares de 1:225:300 [AuNP:BSA:Antigénio].

3.7 | LIGAÇÃO ANTIGÊNIO RSM-SORO POLICLONAL ANTI-ARSM

O soro policlonal utilizado neste ensaio foi *made in house* através da imunização de murganhos Balb/C com o antígeno rsm desenvolvido. O soro é assim constituído por anticorpos policlonais anti-arsm produzidos contra o antígeno rsm (contendo aproximadamente 90% IgM anti-arsm) tendo-se calculado a concentração total de proteína do soro (**TABELA I. 10 - Anexo 7.5** (pág. 67)), de modo a determinar as razões molares de [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] a aplicar. Após seleção das razões molares para o desenvolvimento de AuNP-MUA-BSA-Antígeno, testou-se a ligação do soro com anticorpos anti-arsm aos bionanoconjugados contendo o antígeno rsm, numa simulação das condições do ensaio de diagnóstico pretendido. A avaliação de ligação foi efetuada através de eletroforese em gel de agarose e através da aplicação *eReuss*. Num primeiro estudo, foram testados três tempos de incubação de soro juntamente com os bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antígeno, compostos por razões molares [AuNP:BSA:Antígeno] de 1:225:300, obtidos anteriormente: 1h, 2h e o/n a 4°C. Os resultados da eletroforese e da mobilidade encontram-se no **Anexo 7.12** (pág. 74) - **FIGURA I. 14**, com os géis representativos de cada incubação. Inicialmente testaram-se razões molares crescentes de soro por antígeno de 0,5 a 15. Contudo, o intervalo de razões molares de [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] foi estendido para 0,1 a 10 para uma melhor definição de curva e observação do patamar de mobilidade (**FIGURA 3. 18**).

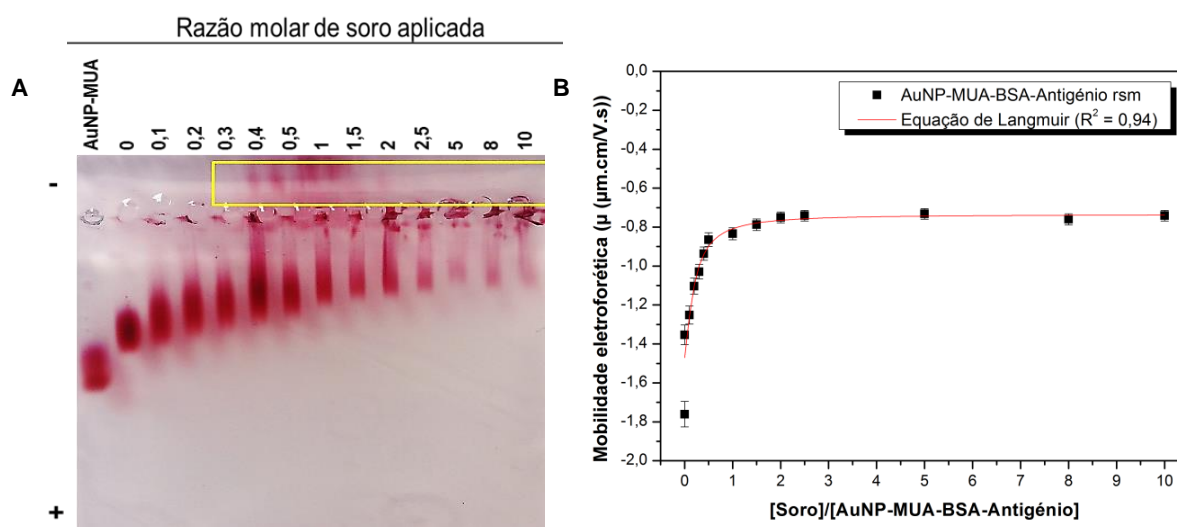


FIGURA 3. 18 | A. Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Estudo de ligação de AuNP-MUA-BSA-Antígeno com soro contendo anticorpos anti-arsm após 1h de incubação, com razões molares [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] de 0 a 10. Ânodo(-)/Cátodo(+) **B. Mobilidade eletroforética (μ)** dos bionanoconjugados. Equação de *Langmuir* e desvio padrão representativo de triplicados.

Através do gel de agarose foi possível inferir a presença de agregação com retenção nos poços a partir das razões molares [Soro]/[Antígeno] de 1,0, observando-se também (tanto no gel da **FIGURA 3. 18** como nos géis presentes no **Anexo 7.12** (pág. 74)) a presença de corrida em sentido contrário à aplicação de corrente elétrica (assinalado a amarelo), bem como o estabelecimento do patamar da mobilidade eletroforética a partir de $-0,8 \mu\text{m.cm/V.s}$, para a razão molar de 1,5. Testou-se também a influência do processo de lavagem na melhoria da qualidade dos géis de agarose dos bionanoconjugados ligados a soro, nomeadamente na tentativa de eliminar o arrastamento observado. Estudou-se assim amostras sem lavagem, ou com 1 ou 2 lavagens em tampão fosfato de

sódio 5mM pH 7,2. As lavagens têm como intuito a remoção de anticorpos policlonais e outras proteínas fracamente ligadas aos bionanoconjugados e que podem provocar arrastamento das bandas na eletroforese. No **Anexo 7.12** (pág. 74)/**FIGURA I. 15** encontram-se os resultados da eletroforese em gel de agarose bem como da mobilidade eletroforética das três condições estudadas, sendo possível inferir que a lavagem dos volumes de bionanoconjugados ligados a soro, duas vezes, permite obter os melhores resultados. Na **FIGURA 3. 19**, é possível observar os resultados obtidos através de eletroforese em gel de agarose e análise da mobilidade eletroforética, após duas lavagens. É também possível comparar a interação de anticorpos anti-arsm com AuNP-MUA-BSA bem como AuNP-MUA-BSA-Antigénio, verificando-se a formação do patamar da migração dos bionanoconjugados a partir da razão molar de [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antigénio] de 1,5. No entanto, a crescente quantidade de agregados (a partir da razão molar de 1) observada pela diminuição da intensidade das bandas bem como a agregação nos poços, no gel anterior, não torna a condição ideal para a ligação entre antigénio e anticorpo, impossibilitando a distinção clara da interação de AuNP-MUA-BSA-Antigénio com os anticorpos anti-arsm presentes no soro. Assim, escolheu-se uma razão molar menor (0,3) para comparação com incubação de bionanoconjugados com razão molar de 1,5.

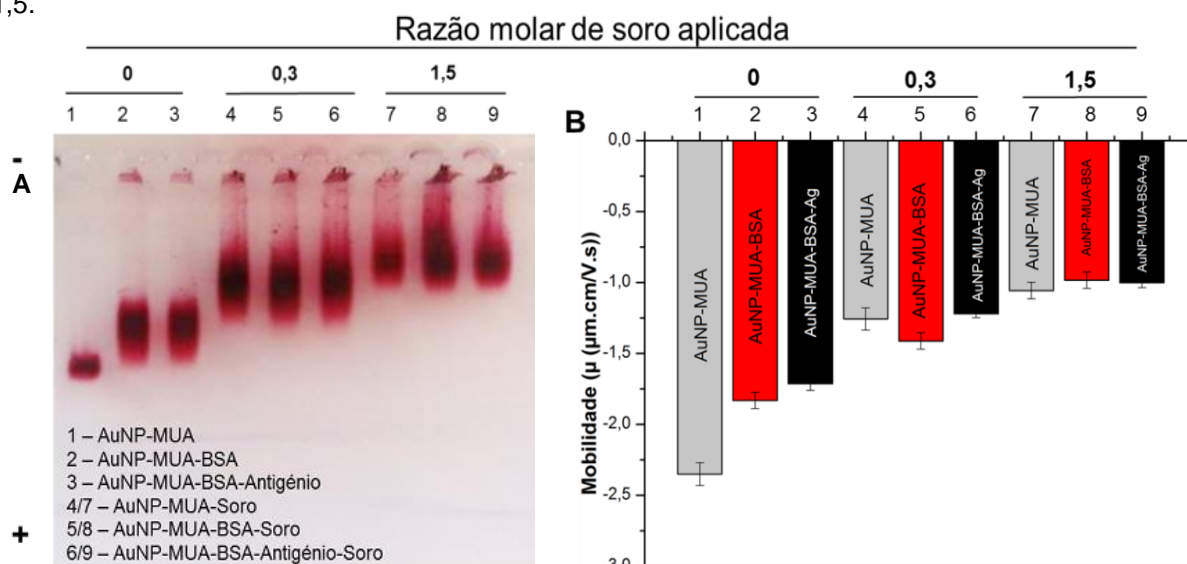


FIGURA 3. 19 | A. Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Ligação dos BNCs a soro após 1h de incubação e 2 lavagens, com razões [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antigénio] de 0, 0,3 e 1,5. Ânodo (-)/Cátodo(+). B. Mobilidade eletroforética (μ) observada para AuNP-MUA (cinzento); AuNP-MUA-BSA (vermelho); AuNP-MUA-BSA-Antigénio (Ag) (preto). Desvio padrão representativo de triplicados.

Na **FIGURA 3. 19**, é possível concluir que a razão molar de 0,3 é suficiente para uma interação eficaz entre antigénio e soro, observável pela ligeira diminuição da mobilidade entre AuNP-MUA-BSA-Soro e AuNP-MUA-BSA-Antigénio-Soro, confirmando também a ligação do soro tanto para 0,3 como 1,5 de maneira estável e reprodutível, verificando-se a diminuição da migração após aplicação do soro aos bionanoconjugados (colunas 4 a 9) em comparação com bionanoconjugados sem soro (coluna 1 a 3). Concluiu-se que a aplicação de uma razão molar de soro por antigénio de 0,3, seguida da incubação durante 1h a 4°C, e dois ciclos de lavagem com centrifugação é a condição ideal para a ligação entre os antigénios e os anticorpos anti-arsm.

4 | DISCUSSÃO

Pneumocystis jirovecii é um fungo atípico com um ciclo de vida bifásico e presente nos pulmões do hospedeiro ligado ao epitélio dos alvéolos pulmonares através dos pneumócitos de tipo I. A aderência aos pneumócitos de tipo I é inicialmente mediada pelas glicoproteínas major de superfície (MSG) com cerca de 95-140kDa, antígenos mais abundantes na superfície de *Pneumocystis* com um papel crucial na interação com o hospedeiro e ativação de resposta imunitária. (Helweg-Larsen, 2004) Estudos sobre a MSG recaem num fragmento recombinante relativamente conservado que codifica a região C-terminal, denominada fragmento MsgC e que demonstra resultados promissores para imunodiagnóstico da PPC. A partir de 3 epítomos hidrofílicos da região C-terminal da proteína MSG, foi produzido um antígeno sintético recombinante multiepítopo (rsm), cuja interação com nanopartículas de ouro se irá estudar na presente dissertação. (Tomás *et al.*, 2016; Tomás, 2014; Djawe *et al.*, 2010; Daly *et al.*, 2004) A disponibilidade de um teste fiável e sensível de *P. jirovecii* proporcionaria um grau de especificidade superior aos métodos correntes e substituiria os métodos de amostragem invasiva utilizados. Assim sendo, e dando seguimento ao trabalho desenvolvido anteriormente no laboratório, efetuou-se a expressão e otimização da purificação do antígeno rsm em *E. coli* XJb(DE3), desenvolveu-se bionanoconjugados compostos por AuNP e antígeno recombinante multiepítopo (rsm) e, de modo a compreender a capacidade de ligação destes bionanoconjugados a soro, testou-se a sua ligação específica a anticorpos anti-rsm presentes em soro policlonal, com o objetivo de desenvolver um teste de diagnóstico serológico rápido para a detecção de anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii* baseado em bionanoconjugados compostos por AuNP conjugadas com um antígeno rsm.

4.1 | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTIGÉNIO RSM EM *E. COLI* XJb(DE3)

O antígeno recombinante sintético multiepítopo foi desenvolvido através da seleção de três epítomos da região C-terminal da proteína MSG, tendo em conta a sua hidrofobicidade e a posição (exterior ou interior da superfície do microrganismo), sempre com o interesse particular em sequências exteriores, em contacto com o sistema imunológico. (Tomás *et al.*, 2016; Tomás, 2014) Assim, o antígeno é composto por três fragmentos hidrofílicos, ligados entre si por pontes de cinco resíduos de glicina – que permitem o *folding* da estrutura tridimensional da proteína (**TABELA I. 2 – Anexo 7.1**). O vetor de expressão selecionado para inserção do antígeno rsm foi o vetor *pLATE31*, um vetor desenvolvido para a expressão de altos níveis de proteína alvo com cauda C-terminal composta por seis resíduos de histidina, facilitando o processo de purificação do antígeno. (**Anexo 7.1**) Este vetor, selecionado para a expressão do antígeno rsm, faz uso do promotor da RNA polimerase T7 (P_{T7}), para o controlo da expressão de genes heterólogos em *E. coli*. Com a expressão do gene de interesse sob controlo deste forte promotor especificamente reconhecido pela RNA polimerase T7, é necessária a clonagem do vetor com a sequência de interesse em estirpes *E. coli* em que a expressão do gene de RNA T7 polimerase esteja sob o controlo de um promotor induzível, como o promotor *lac*. Assim, o vetor de expressão *pLATE31* foi inserido em *E. coli* XJb(DE3). (Coutinho, 2015) A estirpe XJb(DE3) é uma estirpe proveniente de *E. coli* BL21 *star*, que foi geneticamente modificada pela inserção do gene λR (gene da endolisina lítica) na posição do gene *araB*. Assim, a arabinose torna-se um açúcar indutor não metabolizável, que controla a autólise,

sendo este fenótipo induzido pelo promotor P_{BAD} pela presença de arabinose em saturação. A estirpe *XJb(DE3)* apresenta um lisogene, que codifica para a T7 polimerase, necessário para a expressão de proteínas recombinantes. O promotor P_{T7} é codificado pela T7 polimerase sobre o controlo do promotor *lacUV5*, sendo ativado pela indução por IPTG - mimico da alolactase, metabolito de lactose capaz de desencadear a transcrição do operão *lac*. (Dai *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2011)

Para a produção do antígeno rsm em *E. coli XJb(DE3)* isolaram-se colónias de células transformadas através da repicagem de placas de *Petri* inoculadas com células contendo o vetor de expressão *pLATE31* com a sequência do antígeno em estudo. A indução da expressão génica teve início com o estudo de uma colónia transformada com o vetor de expressão através da inoculação e incubação a 37°C em volumes crescentes de meio de cultura, procedendo-se à indução da expressão do antígeno rsm com IPTG (1mM) durante 3h a 37°C, e monitorizando o crescimento pela leitura de absorvância a 600nm entre valores de 0,6 e 1 para confirmação do estabelecimento da fase exponencial de crescimento. Na presença de IPTG, ocorre a indução do promotor T7 (P_{T7}) originando a transcrição do gene de interesse. Por fim, adicionou-se meio fresco com L-arabinose, que permite a indução do fenótipo de autólise, através da ativação da transcrição do gene λR , permitindo que as bactérias sejam lizadas facilmente após ciclos de congelamento-descongelamento (Jia *et al.*, 2011) Posteriormente à indução, prosseguiu-se a lise celular complementada por ciclos de congelação e descongelação por forma a obter uma lise bem-sucedida. Usualmente o método de lise mais utilizado envolve a utilização de lisozima no tampão de lise, no entanto, é uma enzima que apresenta um peso molecular de 15kDa, semelhante ao peso do antígeno (16,7kDa), o que poderia dificultar o processo de purificação e observação correta em SDS-PAGE. Assim, evita-se a sua utilização, graças ao fenótipo de autólise da bactéria através do seu gene λR . As amostras obtidas durante o processo foram avaliadas através de eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% (**FIGURA 3. 1**) onde se observou a presença do antígeno rsm, com um peso molecular de 16,7kDa, nas frações insolúveis e concluindo-se que o antígeno é expresso em corpos de inclusão. Estes resultados encontram-se de acordo com os verificados em ensaios anteriores efetuados no laboratório e que demonstraram qual o produto da cultura celular que permite recuperar a maior quantidade de antígeno rsm. Como concluído, o antígeno rsm encontra-se inserido em corpos de inclusão, agregados proteicos insolúveis de proteínas com *folding* incorreto formadas durante a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*, regularmente localizados no citoplasma, sendo a sua origem atribuída a uma concentração local de *folding* ineficiente bem como a ausência de chaperonas apropriadas. Assim sendo, precisam de um passo de renaturação após o processo de lise que consiste na solubilização dos agregados através da utilização de agentes desnaturantes (e.g. ureia) – passo efetuado no presente estudo, sendo essa a forma final das amostras a purificar. (Upadhyay *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2005) A purificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo foi efetuada através de cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados (IMAC) recorrendo-se à resina IMAC *Sepharose 6 Fast Flow*TM da *GE Healthcare* e a uma coluna *HiTrap*TM da *GE Healthcare*, carregadas com iões Cu^{2+} .

A cromatografia baseia-se na interação entre as proteínas em solução e o ião metálico imobilizado no suporte sólido, sendo usualmente utilizado para a purificação de proteínas recombinantes com

cauda de histidina de forma específica. Estes íões metálicos bpositivos possuem a capacidade de fazer a quelação da proteína alvo através da cauda de histidinas presente na extremidade C-terminal desta, encontrando-se também quelados a um grupo NTA (ácido trinitroacético), que por sua vez foi reticulado com a malha de agarose que compõe a resina. Com o intuito de obter a proteína rsm na sua forma mais pura, testou-se vários ensaios que se encontram descritos na secção **2.1.2** (pág. 21) e no **Anexo 7.2** (pág. 62). Os diferentes produtos gerados foram avaliados por três técnicas diferentes: *Nanodrop*TM, a 280nm, para quantificação proteica de cada fração obtida; por ELISA indireta, que, recorrendo a um soro policlonal primário produzido em murgancho contra a proteína em estudo, origina uma ligação específica ao antígeno rsm, permitindo concluir em que frações da purificação se encontra o antígeno; e por fim, por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%, para observação da presença do antígeno em estudo e de possíveis contaminantes. Num primeiro ensaio foi estudado tampão fosfato de sódio pH 7,4 como tampão de lavagem, ligação e eluição, pois foi um tampão utilizado testado anteriormente no laboratório, servindo como base de comparação relativamente aos restantes. (Coutinho, 2015) A **FIGURA 3. 2** e **FIGURA 3. 3** revelam os resultados obtidos durante a purificação com o tampão referido, onde se verificou um maior valor de absorvância a 280nm – diretamente proporcional à quantidade de antígeno purificado e eluído -, correspondendo ao eluído do conteúdo proteico do lizado bacteriano que não ficou retido na resina. Este diz respeito a todas as proteínas bacterianas expressas, que por não possuírem a cauda poli-histidina característica do antígeno a purificar, não ficaram retidas na resina. Observou-se também a presença de valores altos de absorvâncias, a 405nm, durante a aplicação da amostra revelando que parte do antígeno rsm não adsorveu à resina durante o processo. A obtenção do antígeno rsm durante a purificação bem como a eliminação de proteínas contaminantes é possível pela presença de imidazole nos tampões de lavagem, ligação e eluição. O Imidazole é um composto orgânico que tem a capacidade de substituir a proteína na resina, competindo com as caudas de histidina pela interação com os íões metálicos imobilizados. A baixas concentrações (20mM), o imidazole é utilizado para remoção de proteínas com ligações mais fracas de modo a aumentar a pureza da proteína alvo, e a concentrações mais elevadas, (da ordem dos 500mM) permite a eluição da proteína alvo da coluna com a máxima pureza.

Usualmente nos tampões de eluição também é utilizado 500mM de NaCl com o intuito de eliminar os efeitos de alteração iónica na proteína e que a destabilizam. Para a observação das frações proteicas eluídas com maiores valores de absorvância, analisou-se uma alíquota por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15%, obtendo-se a confirmação da presença do antígeno rsm, com 16,7kDa, bem como de uma proteína contaminante, de cerca de 38kDa. Em estudos efetuados anteriormente, concluiu-se, que o antígeno rsm tende a desnaturar tornando-se insolúvel, após concentração com componentes como o polietilenoglicol 8000 (PEG 8000), acetona ou com *Amicon*, inclusivamente precipitando, sem permitir ressolubilização. (Coutinho, 2015) No presente trabalho, experimentou-se a concentração com PEG8000 – polímero higroscópico com capacidade de absorver água –, após diálise do volume de antígeno purificado - através da utilização de uma fita de diálise de 12,4 MWCO -, verificando-se igualmente a formação de precipitados. Em virtude do exposto, verificou-se o índice

GRAVY (*Grand Average of Hidropathicity*), que indica a solubilidade das proteínas. Quanto ao antígeno rsm sabe-se que apresenta um índice de hidropaticidade de -0,702, sendo uma proteína teoricamente hidrofílica, no entanto, na prática, a proteína apresenta algum grau de insolubilidade. Assim sendo, e devido à instabilidade demonstrada não só neste estudo como em estudos anteriores, decidiu-se não concentrar o antígeno após diálise. (Coutinho, 2015) Esta insolubilidade observada poderá dever-se à expressão do antígeno rsm em estudo em corpos de inclusão, formados devido ao ambiente redutor presente no citosol da bactéria, que não permite a formação de ligações dissulfureto, levando à agregação e requerendo um passo de solubilização e *refolding*. A solubilização de proteínas dos corpos de inclusão utilizando altas concentrações de reagentes caotrópicos, como a ureia, resulta na perda da estrutura secundária proteica com formação de uma estrutura aleatória e possível exposição da superfície hidrofóbica, originando proteínas com características diferentes das originais. (Rosano e Ceccarelli, 2014; Upadhyay *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2005)

Após o primeiro estudo com o tampão fosfato de sódio pH 7,4, foi efetuada a otimização da purificação com outros sete tampões utilizados usualmente em purificação proteica com uma escala de pH crescente. Com o intuito de se compreender qual o tampão que permite a obtenção de maior quantidade de antígeno rsm purificado, para posteriormente utilizar na conjugação com nanopartículas de ouro, foram efetuados seis ensaios de otimização complementados pela avaliação das frações eluídas de 1mL resultantes da purificação por IMAC. Para determinar quais as frações possuem maior quantidade de antígeno purificado, procedeu-se a ELISA indireta, seguida de eletroforese em gel de SDS-PAGE para observação e confirmação da pureza da proteína em estudo bem como o seu peso molecular. Assim sendo, efetuou-se a purificação de oito amostras com os oito conjuntos de tampões – ensaio descrito no **Anexo 7.2** (pág. 62) – encontrando-se os resultados na **FIGURA 3. 4** e **FIGURA 3. 5**. Tendo em consideração a quantidade de antígeno purificado (observável pelos valores de absorvância medidos a 405nm para as primeiras frações de eluição) e a quantidade de contaminante presente nos géis de SDS-PAGE, foi possível concluir que os tampões mais adequados para a purificação são HEPES 7,0/7,5 e Tris-HCl pH 8,0/8,5, pois permitiram obter maior quantidade de antígeno e menor de proteínas contaminantes. De seguida, efetuou-se um ensaio que teve como intuito o aumento da solubilidade do antígeno rsm. Tendo em conta a baixa solubilidade observada, estudou-se a influência da presença de 5% de glicerol no tampão de eluição numa tentativa de manter o antígeno solúvel após concentração. No entanto, os resultados não foram promissores (**FIGURA 3. 6** e **FIGURA 3. 7**) obtendo-se valores de quantidade de proteína purificada baixos nos ensaios com glicerol – ausência de máximos de absorvância elevados e presença de bandas proteicas muito ténues referentes ao antígeno rsm - em comparação com as amostras sem glicerol. A purificação do antígeno com diferentes tampões de lavagem e ligação foi estudada por forma a verificar se alguma combinação conseguiria purificar antígeno sem o contaminante, eliminando a presença de proteínas com interações inespecíficas. No entanto, os resultados presentes na **FIGURA I. 4** e **FIGURA I. 5** demonstram a presença do contaminante para todos os tampões testados, com as maiores bandas de antígeno rsm observadas para purificação unicamente com HEPES pH 7,5 e Tris-HCl pH 8,0. O penúltimo ensaio foi unicamente efetuado com

o intuito de demonstrar a capacidade de purificação de cada tampão, optando-se, de acordo com o observado na **FIGURA 3. 8**, pelo tampão Tris-HCl pH 8,0, como tampão ideal de purificação. De acordo com os resultados obtidos foi possível desenvolver um protocolo otimizado para a purificação do antígeno rsm, que permitiu a purificação de dez amostras com tampão Tris-HCl pH 8,0 – ensaio descrito no **Anexo 7.2**. Através dos valores de absorvância, obtidos para as primeiras frações de eluição de cada purificação (**FIGURA I. 6**), e das bandas proteicas com elevada intensidade verificadas por SDS-PAGE a 15% - **FIGURA 3. 9** – é possível inferir sobre a obtenção de volumes eluídos com elevada quantidade de proteína purificada. Contudo, em todos os ensaios efetuados verificou-se a presença da proteína contaminante com 38kDa. Numa tentativa de verificar qual a origem deste contaminante efetuou-se *Western-blot*, cujos resultados se encontram no **Anexo 7.9**.

Efetuaram-se dois protocolos (secção **2.2.3** – pág. 24). Um primeiro, usualmente realizado (**FIGURA I. 7A**), e, um segundo protocolo, com o intuito de eliminar as reações cruzadas do anticorpo conjugado para as proteínas de *E. coli*, de modo a eliminar anticorpos para *E. coli*, observando-se a não marcação do contaminante (**FIGURA I. 7B**) em comparação com o resultado obtido com a aplicação do primeiro protocolo. No final, juntou-se as primeiras 8 frações de eluição do antígeno, escolhendo-se os volumes obtidos nas purificações 1 a 6 para diálise (**FIGURA 3. 10A**). Os componentes em elevadas concentrações presentes no tampão de eluição, como Imidazole (500mM) e NaCl (500mM), permitem a redução das interações não específicas de proteínas contaminantes com a coluna IMAC e mantêm a força iônica da solução proteica aumentando a sua solubilidade e estabilidade, no entanto, para a interação do antígeno com as AuNP, este não se pode encontrar em concentrações salinas e de imidazole altas, pois permitem a destabilização e consequentemente a formação de agregados de AuNP. Assim sendo, dialisou-se as amostras para o tampão 10mM Tris-HCl, 20mM NaCl, 2% glicerol, pH 8,0, sendo o pH do tampão após a diálise, 0,5 unidades abaixo do pI da proteína (ponto isoelétrico = 8,57). A presença de glicerol – cosolvente - no tampão de diálise teve como intuito a estabilização estrutural da proteína, que já se verificou ser instável, inclusivamente, após diálise (**FIGURA 3. 10B**). O glicerol estabiliza e previne a agregação proteica durante o *refolding* de proteínas recombinantes, encontrando-se descrito também como estabilizador de intermediários proteicos sem *folding*, como os observados após solubilização de corpos de inclusão, interagindo com os locais hidrofóbicos e aumentando a sua estabilidade. (Vagenende *et al.*, 2009; Bondos e Bicknell, 2003) Como estabilizadores foram testados também DTT, etanol e glutatona oxidada/reduzida, no entanto, sem resultados positivos ou conclusivos, excluindo-se a sua utilização. (Lebendiker e Danieli, 2014) No final do processo de purificação por IMAC, foram obtidas duas soluções dialisadas de antígeno com concentração de 6,1mg/mL e 8,5mg/mL.

4.2 | BIONANOCONJUGADOS COMPOSTOS POR ANTIGÉNIO RSM

O desenvolvimento de bionanoconjugados estáveis e robustos, foi iniciado pela síntese de nanopartículas de ouro através do método de Turkevich, um método reprodutível que permite o desenvolvimento de AuNP com concentrações e diâmetros idênticos. (Turkevich *et al.*, 1951) O processo de síntese pode ser observado na **FIGURA 3. 11A**, onde se verificam os vários passos de formação de AuNP estabilizadas com citrato desde a aplicação do ouro (solução amarela), seguida

da adição do agente de redução citrato de sódio (solução incolor), que reduz o sal de ouro em solução como resposta à oxidação (solução preta). À medida que as AuNP se formam, os iões de citrato adsorvem à sua superfície, conferindo uma carga negativa e prevenindo a agregação das AuNP devido às repulsões electrostáticas, agindo como um agente estabilizador e de *capping* das AuNP (solução vermelha). (Brewer *et al.*, 2005)

A espectroscopia de UV-Vis foi utilizada ao longo da presente dissertação para obtenção dos espectros de extinção das AuNP permitindo o cálculo do tamanho e da concentração das AuNP e a comparação da largura das bandas, dos índices de agregação relacionados com a estabilidade coloidal e dos desvios de SPR após funcionalização e conjugação. Segundo o método de Haiss (2007), utiliza-se o quociente entre a absorvância máxima de AuNP no máximo da banda SPR e a absorvância a 405nm para obter um valor de coeficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$), pré-definido e tabelado, utilizado no cálculo da concentração das AuNP (secção 2.3.2). (Haiss *et al.*, 2007) Na **FIGURA 3. 11B**, encontra-se representado o espectro de UV-Vis para as nanopartículas sintetizadas pelo método de Turkevich, e que apresentam um espectro com absorvância máxima da banda de SPR centrada a 520nm, conferindo à solução uma cor vermelha, com AuNP com 16nm e 7,89nM. Averiguou-se também que a solução coloidal de AuNP sintetizadas aparenta ser monodispersa, pois apresenta uma banda de SPR estreita. O quociente entre a absorvância máxima de banda de SPR (520nm) e a absorvância a 600nm, desta solução coloidal é de 0,19, indicando um bom estado da solução sem agregação. Sabendo que a largura da banda de SPR encontra-se relacionada com amostras menos monodispersas, o índice de agregação pode ser um bom indicador das diferenças no estado de monodispersão de soluções coloidais de AuNP. (Haiss *et al.*, 2007) No entanto, só deve ter sido em conta como indicação, sendo necessária comparação entre amostras para uma indicação da diferença do estado de agregação da amostra, pois não foi totalmente correlacionado com o grau de monodispersão da amostra como ocorre numa técnica de caracterização de elevada resolução como microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Também para a conjugação de AuNP com proteína, foi calculado o índice de agregação, servindo de indicador relativamente à eficiência da conjugação e estabilidade de formação de bionanoconjugados. A síntese efetuada fornece às AuNP um revestimento de iões de citrato que pode ser substituído, graças a moléculas com um grupo químico com maior afinidade para o ouro que a ligação electrostática observada entre os grupos terminais do citrato e o ouro. Assim, após a síntese efetuou-se a funcionalização das AuNP com MUA (11-mercaptoundecanóico) ou com pentapéptido CALNN (constituído por cinco aminoácidos – cisteína, alanina, leucina e duas asparaginas), que apresentam grande afinidade para o ouro devido à presença do grupo tiol (-SH) nas suas estruturas. (Gomes *et al.*, 2012; Lévy *et al.*, 2004)

De modo a compreender qual confere maior estabilidade às AuNP e permite a formação de bionanoconjugados robustos, utilizaram-se razões molares [MUA]/[AuNP] e [CALNN]/[AuNP] de 5000 e 1000, respetivamente, previamente definidas no laboratório. MUA e CALNN são moléculas estudadas para atuarem como agentes de revestimento conferindo carga negativa às AuNP. Os pequenos péptidos como CALNN fazem a ligação com AuNP, através dos grupos sulfidrílo presentes na cisteína. A cisteína é seguida de uma alanina e leucina que possuem cadeias laterais hidrofóbicas permitindo a montagem dos péptidos na superfície das AuNP através de interações intermoleculares,

mantendo a sua estabilidade. Por sua vez, os dois resíduos de asparagina, bastante hidrofílicos, presentes na extremidade exposta à solução, conferem estabilidade coloidal às AuNP funcionalizadas com este pentapéptido. MUA destaca-se como alcanótiol utilizado em técnicas de conjugação de AuNP com proteínas, com o grupo sulfidrílo presente numa das extremidades da molécula com capacidade de ligação covalente às AuNP. Após incubação, a funcionalização foi comprovada através da observação dos máximos de absorvância para AuNP não funcionalizadas e funcionalizadas.

A **FIGURA 3. 12A e B** revela os resultados obtidos através de espectroscopia de UV-Vis permitindo a observação de um desvio entre 3-4nm para comprimentos de onda maiores - em comparação com o máximo de SPR verificado para AuNP-Citrato - para AuNP-CALNN e AuNP-MUA, respetivamente, demonstrando um aumento no índice de refração resultante da troca de agente de revestimento das AuNP, sendo este desvio indicativo da funcionalização de AuNP bem-sucedida. (Kimling *et al.*, 2006) Após funcionalização foi estudada a conjugação de AuNP com o antígeno rsm anteriormente expresso e purificado. Para além do estudo da conjugação com AuNP funcionalizadas com MUA e CALNN, foi também testada, a influência da reticulação química (*cross-linking*) na conjugação. Para tal, usaram-se os reagentes: EDC e NHS - agentes químicos que permitem a reticulação entre AuNP funcionalizadas e biomoléculas através da formação de ligação peptídica entre o grupo ácido superficial do ligando que funcionaliza as AuNP e os grupos amina das cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos do antígeno rsm. (Guirgis *et al.*, 2012; Bartczak e Kanaras, 2011) A fim de obter uma melhor conjugação, foi igualmente testada uma abordagem inovadora que recorre à incubação prévia do antígeno rsm a conjugar com BSA – proteína utilizada normalmente como bloqueante de ligações inespecíficas. (Tsai *et al.*, 2011; Thobhani *et al.*, 2010) No entanto, na presente dissertação pretendeu-se estudar a BSA como transportador de pequenos antígenos para o desenvolvimento de bionanoconjugados e imunodiagnóstico, algo que ainda não se encontra demonstrado na literatura. A conjugação com o antígeno rsm foi comprovada através da caracterização de AuNP não funcionalizadas, AuNP funcionalizadas com MUA e CALNN, e estas últimas, conjugadas com antígeno (AUNP-MUA-Antígeno ou AuNP-CALNN-Antígeno), por espectroscopia de UV-Vis e por eletroforese em gel de agarose. Para o estudo da formação dos bionanoconjugados compostos por: AuNP-MUA-Antígeno; AuNP-CALNN-Antígeno; AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno e AuNP-MUA-BSA-Antígeno, testaram-se diferentes razões molares [Antígeno]/[AuNP-MUA]; [Antígeno]/[AuNP-CALNN]; [Antígeno]/[AuNP-MUA-EDC/NHS] e [BSA-Antígeno]/[AuNP-MUA], desde 0 a 1500. Os bionanoconjugados ao conterem diferentes quantidades de proteína a revestir a superfície das AuNP irão possuir carga superficial, tamanho diferente, e consequentemente, a sua mobilidade em eletroforese em gel de agarose é distinta.

Variando a razão molar de antígeno é possível inferir sobre a condição que permite a formação de coroa proteica completa em redor das AuNP, algo verificado devido à saturação das AuNP com antígeno originando um patamar na mobilidade eletroforética ao aumentar as razões molares de antígeno nos bionanoconjugados. Este patamar é formado devido à migração para o polo positivo, dos bionanoconjugados, observada no gel de agarose, que se deve à grande densidade de carga negativa presente nos bionanoconjugados, inversamente proporcional à quantidade de proteína

adsorvida à superfície das AuNP. A combinação de resultados obtidos permite inferir qual dos ligandos testados permite a formação de bionanoconjugados estáveis e determinar qual a razão molar de antígeno é a mais indicada para a obtenção da coroa compacta de antígeno em torno da AuNP. Para AuNP-MUA-Antígeno - **FIGURA 3. 13A, B e FIGURA 3. 14** – verificou-se uma mobilidade média constante de $-3,30\mu\text{m.cm/V.s}$ e para AuNP-CALNN-Antígeno –**FIGURA 3. 15A, B e FIGURA 3. 16** – verificou-se uma mobilidade média de $-2,25\mu\text{m.cm/V.s}$, verificando-se também um maior índice de agregação para CALNN em comparação com MUA, excluindo este ligando como ideal para o processo de formação de bionanoconjugados estáveis.

De seguida, testou-se bionanoconjugados compostos por AuNP-MUA-EDC/NHS-Antígeno. Para a formação de ligações estáveis com EDC/NHS, deve ter-se em atenção parâmetros como: (1) o pH da reação; (2) a quantidade de EDC, de modo a não provocar agregação devido à perda de forças repulsivas electrostáticas entre AuNP, e (3) o rácio de EDC/NHS aplicada à solução de nanopartículas. (Conde *et al.*, 2014) Assim sendo, testou-se vários tampões e concentrações de EDC/NHS – **Anexo 7.6** – de modo a melhorar a interação do antígeno com as AuNP. Nestes ensaios, incubou-se EDC/NHS nas respetivas concentrações e tampões, com as soluções de AuNP funcionalizadas com MUA, adicionando-se as razões molares [Antígeno]/[AuNP-MUA-EDC/NHS] de 0 a 1500. Por fim, os espectros de UV-Vis de bionanoconjugados correspondentes à razão molar de 300 ([Antígeno]/[AuNP-MUA-EDC/NHS]) (**FIGURA I. 8, Anexo 7.10**), permitiram compreender qual o tampão e concentração de EDC/NHS que provoca menor agregação. Concluiu-se que as concentrações ideais a estudar são: 0,2mM EDC/0,8mM NHS em PBS1x; 1mM EDC/1mM NHS em tampão MES; 0,2mM EDC/0,2mM NHS em Água Milli-Q e 0,4mM EDC/0,8mM NHS em Tampão Fosfato (PB), observando-se nas restantes uma alteração de cor da solução de AuNP, bem como a formação de agregados. Contudo, não foi possível inferir sobre o estabelecimento do patamar da mobilidade eletroforética, através dos resultados obtidos (**FIGURA I. 9 e FIGURA I. 10**), observando-se a formação de agregados, comprovado pelo aumento do índice de agregação, excluindo-se EDC/NHS, na formação de bionanoconjugados. De seguida, testou-se a formação de bionanoconjugados com BSA. Na presente dissertação, estudou-se bionanoconjugados formados por AuNP-MUA-BSA-Antígeno, onde se incubou o antígeno em conjunto com diferentes razões molares [BSA]/[Antígeno] de 0,1 a 1, posteriormente, aplicando razões molares [BSA-Antígeno]/[AuNP-MUA] de 0 a 1500, com o intuito de observar e testar a teoria de BSA como proteína transportadora de pequenos antígenos (neste caso, com 16,7kDa, tendência para comportamento hidrofóbico e uma cauda C-terminal de histidinas carregadas positivamente).

Os resultados da **FIGURA I. 12** apresentam os valores de mobilidade para cada razão [BSA]/[Antígeno] e [BSA-Antígeno]/[AuNP-MUA] testada, onde se observou a presença constante de uma diferença média de $-0,2\mu\text{m.cm/V.s}$ entre bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA e AuNP-MUA-BSA-Antígeno, comprovando a adsorção do antígeno à BSA, e funcionando como um complexo de maior tamanho e carga, e migrando menos em comparação com AuNP-MUA-BSA. De todas as razões molares [BSA]/[Antígeno] testadas concluiu-se que 0,75 seria a melhor para a formação de coroa proteica à volta das AuNP, e que a razão molar [BSA]/[Antígeno] de 1, fornece um excesso de

concentração de BSA, observada pela inferior mobilidade de AuNP-MUA-BSA em comparação com a observada para AuNP-MUA-BSA-Antigénio, interferindo com a capacidade de observação de presença/ausência do antigénio no complexo BSA-Antigénio. (**FIGURA I. 13**) Efetuou-se também um gel de agarose para as razões molares crescentes [BSA-Antigénio]/[AuNP-MUA] de 0 a 1500 (**FIGURA 3. 17**), onde se observou uma diminuição de mobilidade, $-1,0\mu\text{m.cm/V.s}$, em comparação com o observado para AuNP-MUA-BSA ($-1,3\mu\text{m.cm/V.s}$), atingindo o patamar para uma razão de 300. Assim sendo, a formação bem sucedida de bionanoconjugados compostos por AuNP-MUA-BSA-Antigénio foi estabelecida com razões molares de 1:225:300 ([AuNP-MUA]/[BSA]/[Antigénio]). Em dúvida permanece a forma como o antigénio estabelece a ligação, sendo necessário efetuar estudos de afinidade de forma a compreender a ligação entre o antigénio e a BSA, e, entre este complexo e as AuNP funcionalizadas. Os resultados são promissores, no entanto, a literatura disponível sobre a capacidade de adsorção de pequenos antigénios à BSA é limitada. A proteína BSA é uma proteína multifuncional que efetua o transporte atuando como transportador de ácidos gordos insolúveis no sistema circulatório, sendo estudada, atualmente, como transportador de fármacos (Zhang *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2011) A BSA é inclusivamente utilizada como proteína transportadora de haptenos, através de reticulação, permitindo o desenvolvimento de resposta imune (Gibbs, 2001), sendo também utilizada regularmente nos ensaios com AuNP como bloqueante, de modo a evitar ligações inespecíficas, e como estabilizadora de bionanoconjugados. (Thobhani *et al.*, 2010)

A BSA é apropriada para estudos de ligação devido à sua elevada estabilidade, solubilidade e disponibilidade em elevada pureza, tendo a capacidade de formar ligações hidrofóbicas, eletrostáticas e através de pontes de hidrogénio, importantes na formação de complexos. O pH da solução afeta a adsorção de BSA, de acordo com o seu ponto isoelétrico que é atingido para pH 4,5-5, significando que a proteína é carregada negativamente a pH 7-8 e positivamente a pH ácido. No entanto, a superfície da BSA apresenta diferenças de cargas, influenciadas pela presença de aminoácidos carregados negativamente, como o ácido glutâmico e aspártico, e resíduos carregados positivamente, como as histidinas e lisinas. (Phan *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2014) A preferência comprovada de BSA para superfícies carregadas negativamente, a pH 7-8 (pH a que as experiências são conduzidas), torna a BSA carregada negativamente, no entanto, a presença de 60 lisinas superficiais carregadas positivamente permite o desenvolvimento de ligações electrostáticas entre a BSA e AuNP-MUA carregadas negativamente. (Phan *et al.*, 2015; Conde *et al.*, 2014; Brewer *et al.*, 2005) As ligações eletrostáticas permitem um método simples de conjugação de nanopartículas com biomoléculas, dependente da quantidade de carga presente nas AuNP e nas biomoléculas, bem como do ponto isoelétrico das biomoléculas em estudo. (Conde *et al.*, 2014; Brewer *et al.*, 2005) No entanto, a BSA também apresenta a capacidade de formação de ligações hidrofóbicas, interações estabelecidas através dos bolsos hidrofóbicos – presentes em cada domínio da BSA – e que permitem o *docking* molecular. (Zhang *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2011; Thobhani *et al.*, 2010) Assim, de modo a estender a compreensão sobre a estrutura do antigénio, avaliou-se a sua sequência de aminoácidos (**Anexo 7.1 - TABELA I. 2**) através do *Protparam* do *website* ExPASy, o que revelou um índice alifático de 64,01 mol%. O método do índice alifático prevê a estabilidade regional através do cálculo do volume relativo

ocupado por cadeias laterais alifáticas – com aminoácidos alanina, valina, isoleucina e leucina – funcionando com um indicador de termoestabilidade proteica. (Gasteiger *et al.*, 2005) Um dos tipos de interações estabelecidas, descritos, e efetuados pela BSA relativamente a outros compostos, são as interações hidrofóbicas, observadas maioritariamente entre aminoácidos alifáticos (*Gly*, *Ala*, *Val*, *Leu*, *Ile* e *Pro*) não polares. (Zhang *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2014) Assim, parece razoável assumir que o antígeno rsm apresenta capacidade de ligação à BSA, graças a interações entre os resíduos alifáticos dos bolsos hidrofóbicos da BSA e do antígeno rsm.

4.3 | ESTUDO DA LIGAÇÃO DO SORO POLICLONAL AO ANTIGÉNIO RSM

Finalmente foi tido como foco a interação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antígeno rsm e o soro policlonal anti-arsm. Avaliou-se o efeito de diferentes tempos de incubação (1h, 2h e o/n a 4°C) na formação de ligações entre os bionanoconjugados e os anticorpos presentes no soro policlonal, bem como diferentes razões molares [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno rsm] de 0 a 15. Verificou-se nos géis de agarose (**FIGURA I. 14 – Anexo 7.12; FIGURA 3. 18**) o estabelecimento de um patamar de mobilidade eletroforética, e subsequente saturação dos bionanoconjugados com anticorpos anti-arsm, a partir de $\approx 0,7 \mu\text{m.cm/V.s}$ para a razão molar [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] de 1,5, sendo preferencial a incubação durante 1h a 4°C de modo a evitar a agregação das AuNP. Observou-se também a presença de mobilidade de bionanoconjugados em ligação a soro policlonal, no sentido negativo (**FIGURA 3. 18**). Esta mobilidade pode dever-se ao facto de o soro policlonal não ter passado por um processo de purificação, como tal possui, na sua constituição proteínas contaminantes que após ligação aos bionanoconjugados, poderão tornar os complexos globalmente positivos, resultando na migração eletroforética de AuNP-MUA-BSA-Soro para o polo negativo. Em segundo lugar, foi estudado o efeito de lavagens na ligação entre os bionanoconjugados e o soro, com o intuito de eliminar as proteínas contaminantes presentes e que influenciam a qualidade da ligação dos bionanoconjugados ao soro, levando a arrastamentos durante a eletroforese. No **Anexo 7.12 (pág. 74)/FIGURA I. 15** encontram-se os resultados obtidos das três condições estudadas, inferindo-se que a lavagem dos bionanoconjugados, duas vezes, permite a eliminação da maior quantidade de proteínas contaminantes. Efetuou-se eletroforese em gel de agarose, após duas lavagens com 1h de incubação, para as razões molares [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] de 0,3 e 1,5 (**FIGURA 3. 19**). Apesar do estabelecimento do patamar para a razão molar de 1,5, a crescente quantidade de agregados (a partir da razão molar de 1), impossibilita a distinção clara entre a interação de AuNP-MUA-BSA e AuNP-MUA-BSA-Antígeno com o soro policlonal. Na **FIGURA 3. 19**, é possível concluir que a razão molar de 0,3 é suficiente para uma interação eficaz entre antígeno e anticorpo, observando-se uma diferença de mobilidade entre AuNP-MUA-BSA-Anticorpo e AuNP-MUA-BSA-Antígeno-Soro, confirmando também a ligação do anticorpo (colunas 4 a 9), de maneira estável e reprodutível, em comparação com bionanoconjugados sem anticorpo (coluna 1 a 3).

Concluiu-se que a aplicação de uma razão molar de [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] de 0,3, seguida da incubação durante 1h a 4°C, e 2 ciclos de lavagem com centrifugação é a condição ideal para a ligação entre os antígenos e os anticorpos.

5 | CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de um imunoensaio baseado em nanopartículas de ouro (AuNP) para a detecção rápida de anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii*. Para tal, foi necessária a otimização da expressão e da purificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo, anteriormente desenvolvido a partir de sequências específicas constituintes da proteína de superfície Msg de *P. jirovecii*. (Tomás, 2014) Após otimização da purificação do antígeno rsm por IMAC, conjugou-se o antígeno com as AuNP, adequadamente funcionalizadas, para a formação de bionanoconjugados AuNP-Antígeno rsm estáveis. Finalmente, estudou-se a capacidade de ligação dos bionanoconjugados aos anticorpos anti-arsm, presentes em soro policlonal produzido em murganho.

No presente estudo: 1) otimizou-se a purificação do antígeno sintético recombinante multiepítipo, concluindo-se que o melhor tampão para o efeito é o tampão Tris-HCl pH 8,0 [20mM Tris-HCl; 500mM NaCl; 500mM Imidazole; pH 8,0]; 2) obteve-se o antígeno recombinante sintético multiepítipo na sua forma mais pura; e 3) desenvolveu-se bionanoconjugados estáveis, robustos e com resultados reprodutíveis ao longo dos ensaios, constituídos por AuNP-MUA-BSA-Antígeno rsm, indicando que a BSA parece ter capacidade de se ligar a antígenos com características hidrofóbicas, permitindo o desenvolvimento de imunoensaios com base bionanotecnologia. Para a formação destes bionanoconjugados foi, no entanto, necessária a diálise prévia das amostras de antígeno rsm para o tampão Tris-HCl pH 8,0 [10mM Tris-HCl; 20mM NaCl; 2% glicerol; pH 8,0], devido à presença de elevadas concentrações de imidazole e NaCl no tampão de eluição, provenientes do processo de purificação do antígeno. Com este tampão isento de sais, foi assim possível o estudo com AuNP esféricas sem o risco de ocorrência da sua agregação. Graças à formação de complexos BSA-Antígeno, foi possível desenvolver bionanoconjugados estáveis e robustos compostos por razões molares de 1:225:300, relativas a [AuNP]/[BSA]/[Antígeno], que apresentam uma capacidade ótima de ligação a soro policlonal contendo anticorpos anti-arsm.

A presente dissertação permitiu também inferir sobre a capacidade de ligação do soro policlonal aos bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antígeno, concluindo-se que para a razão molar [Soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] de 0,3, verifica-se uma ligação preferencial dos anticorpos pelos bionanoconjugados.

Futuramente, e de modo a aprofundar os conhecimentos obtidos ao longo da dissertação, poder-se-ão efetuar os seguintes estudos:

- Caracterização dos bionanoconjugados complementada por técnicas de dispersão de luz tais como com potencial zeta, dispersão de luz dinâmica (DLS) e NTA (*Nanoparticle-tracking analysis*). O potencial zeta está relacionado com a carga superficial da camada de hidratação das AuNP. Através da sua medição, não só é possível provar que efetivamente existe conjugação entre biomoléculas e AuNP como também determinar qual a concentração de biomoléculas que satura a superfície das AuNP.

- Estudo estrutural por cristalografia de raios-X e/ou Ressonância Magnética Nuclear do antígeno recombinante sintético multiepítopo: Este estudo não se encontra efetuado e poderia auxiliar na compreensão da estrutura proteica e elucidar sobre a forma como o antígeno se liga à BSA – através de simulação -, e sobre a razão das suas características hidrofóbicas – apesar de estar descrito como maioritariamente hidrofílico.
- Purificação do soro policlonal, de modo a poder-se averiguar a presença/ausência de interações das nanopartículas com possíveis contaminantes presentes no soro.

Em último recurso, poderá ser efetuada a alteração da bactéria utilizada na expressão do antígeno rsm: Como verificado anteriormente, a proteína rsm é desenvolvida durante a expressão em corpos de inclusão. Como alternativa à *E. coli* XJb(DE3) utilizada na presente dissertação, foram desenvolvidas pela Novagen, estirpes denominadas *Origami*TM, nomeadamente *Origami*TM2(DE3), que apresentam mutações nos genes da tioredoxina reductase (*trxB*) e glutathione reductase (*gor*) permitindo o desenvolvimento de ligações dissulfureto no citoplasma de *E. coli* e corrigindo a tendência para o desenvolvimento de corpos de inclusão, cuja formação leva, maioritariamente, ao desenvolvimento de proteína com *folding* incorreto e tendências hidrofóbicas. Estas estirpes incluem também a cópia cromossomal do gene *RNA polimerase T7* sob o controlo do promotor *lacUV5*, tal e qual como a estirpe XJb(DE3). (Lebediker e Danieli, 2014)

Após a concretização destes ensaios, juntamente com os resultados obtidos neste projeto de Mestrado, será possível o desenvolvimento de um teste serológico rápido para a detecção de anticorpos circulantes anti-*P. jirovecii*, para além de revelar uma capacidade inerente da BSA como transportador de pequenos antígenos, capacidade essa que não se encontra descrita na literatura consultada.

6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliouat-Denis, C.-M., Chabé, M., Demanche, C., *et al.* 2008. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, Genetics and Evolution* **8** (2008): 708–726.
- Aliouat-Denis, C.M., Martinez, A., Aliouat, E.M., *et al.* 2009. The *Pneumocystis* life cycle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**(3): 419–426.
- Almeida, M., Pereira, E., Baptista, P., *et al.* 2014. Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors. *In* Comprehensive Analytical Chemistry. Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry (M. Valcárcel e A.I. López-Lorente eds), 4ª ed., pp 529–567, Elsevier, Amsterdam.
- Arruebo, M., Valladares, M., e González-Fernández, Á. 2009. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials* **1** – 24.
- Baptista, P., Doria, G., Henriques, D., *et al.* 2005. Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of Biotechnology* **119** (2005): 111–117.
- Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., *et al.* 2007. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**: 943–950.
- Bartczak, D., e Kanaras, A.G. 2011. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir* **27**: 10119–10123.
- Bava, A.J., Cattáneo, S., e Bellegarde, E. 2002. Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **44**(5): 279–282.
- Beck, J.M., e Cushion, M.T. 2009. *Pneumocystis* Workshop: 10th Anniversary Summary. *Eukaryotic Cell* **8**(4): 446–460.
- Benfield, T.L., Lundgren, B., Levine, S.J., *et al.* 1997. The major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* induces release and gene expression of interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha in monocytes. *Infection and Immunity* **65**(11): 4790–4794.
- Bigby, T.D., Margolskee D., Curtis J.L., *et al.* 1986. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. 515-518
- Bondos, S.E., e Bicknell, A. 2003. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical Biochemistry* **316**: 223–231.
- Brewer, S.H., Glomm, W.R., Johnson, M.C., *et al.* 2005. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir* **21**(20): 9303–9307.
- Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N., *et al.* 2009. Antibody-based sensors: Principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors* **9**(6): 4407–4445.
- Calderón, E.J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I., *et al.* 2010. *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **8**(6): 683–701.
- CDC. 2014. *Pneumocystis*. Versão 1 de Agosto de 2015. <http://www.cdc.gov/dpdx/Pneumocystis/index.html> in CDC - Centers for Disease, Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/>.
- Chagas, C. 1909. Trabalho do Instituto Manguinhos sobre uma nova Trypanosomiase humana. *Ann Acad Med Rio Janeiro* **75**: 188–190.
- Conde, J., Dias, J.T., Grazú, V., *et al.* 2014. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front. Chem.* **2**(48): 1-28.
- Coutinho, M. 2015. Desenvolvimento de um teste de diagnóstico serológico rápido para a detecção de *Pneumocystis jirovecii* em amostras clínicas. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Dai, J., Jiang, M., Wang, Y., *et al.* 2012. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**(3): 338–342.
- Daly, K.R., Fichtenbaum, C.J., Tanaka, R., *et al.* 2002. Serologic Responses to Epitopes of the Major Surface Glycoprotein of *Pneumocystis jirovecii* Differ in Human Immunodeficiency Virus – Infected and Uninfected Persons. *J. Infect. Dis.* **186**: 644–651.
- Daly, K.R., Koch, J., Levin, L., *et al.* 2004. Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Serologic Responses to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg. Infect. Dis.* **10**(5): 848–854.
- Daly, R.K., Koch, J.V., Shire, N.J., *et al.* 2006. Human immunodeficiency virus-infected patients with

prior *Pneumocystis* pneumonia exhibit increased serologic reactivity to several major surface glycoprotein clones. Clin. Vaccine Immunol. **13**(10): 1071–1078.

Delanoe, P., e Delanoe, M. 1912. Sur le rapports des kystes de *Carinii* du poumon des rats avec Trypanosoma lewisi. Acad. Sci. **155**: 658–660.

Djave, K., Huang, L., Daly, K.R., et al. 2010. Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. PLoS One **5**(12): 1–8.

Durand-Joly, I., Chabé, M., Soula, F., et al. 2005. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **45**: 405–410.

Edman, J.C., Kovacs, J.A., Masur, H., et al. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature **334**(11): 519–522.

Engvall, E., e Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry **8**(9): 871–874.

Franco, R., e Pereira, E. 2012. Gold Nanoparticles and Proteins, Interaction. In Encycl. Met. pp 908–915.

Gan, S.D., e Patel, K.R. 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J. Invest. Dermatol. **133**(9):1 – 3.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., et al. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In The Proteomics Protocols Handbook. (J.M. Walker ed). pp 571-607, Humana Press Inc., NJ.

GE Healthcare. 2009. Recombinant Protein Purification Handbook: Principles and Methods. Uppsala, Sweden.

Gellissen, G. Escherichia coli. 2005. In Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. pp 7-43, Wiley-VCH, Weinheim.

Gibbs, J. 2001. Effective Blocking Procedures. ELISA Tech. Bul - No. 3. Corning Inc. Life Sci. pp 1–6. Kennebunk, ME

Gingo, M.R., Lucht, L., Daly, K.R., et al. 2011. Serologic responses to *Pneumocystis* Proteins in Human Immunodeficiency Virus Patients With and Without *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. J. Acquir. Immune Defic. Syndr **57**(3): 190–196.

Gomes, I., Feia, M.J., Santos, N.C., et al. R. 2012. Controlled adsorption of cytochrome c to nanostructured gold surfaces. J. Nanopart. Res. **14**: 1–12.

Guirgis, B.S.S., Sá, C., Gomes, I., et al. 2012. Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. Anal Bioanal Chem **402**: 1019–1027.

Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., et al. 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. Anal. Chem. **79**(11): 4215–4221.

Helweg-Larsen, J. 2004. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. Dan. Med. Bull. **51**(3): 251–273.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol. Res. **111**(5): 509–547.

Huang, L., Cattamanchi, A., Davis, J.L., et al. 2011. HIV-Associated *Pneumocystis* Pneumonia. Proc Am Thorac Soc **8**: 294–300.

Huang, X., e El-Sayed, M.A. 2010. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. J. Adv. Res. **1**: 13–28.

Huggett, J.F., Taylor, M.S., Kocjan, G., et al. 2008. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. Thorax **63**: 154–159.

Turkevich, J., Stevenson, P.C., e Hillier, J. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss. Faraday Soc. **11**: 55 – 75.

Janson, J.-C, Ersson B. e Rydén L. 2011. Introduction to protein purification. In Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. (J.C. Janson ed) 3ª ed., pp 3-22, Wiley Series in Methods of Biochemical Analysis, NJ.

Jia, C.P., Zhong, X.Q., Hua, B., et al. 2009. Nano-ELISA for highly sensitive protein detection.

Biosens. Bioelectron. **24**(9): 2836–2841.

Jia, X., Kostal, J., e Claypool, J.A. 2011. United States Patent - Controlled lysis of bacteria. **2**(12): 1-24.

Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., *et al.* 2006. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited.pdf. J. Phys. Chem. B **110**: 15700–15707.

Kottom, T.J., e Limper, A.H. 2000. Cell wall assembly by *Pneumocystis carinii*: Evidence for a unique Gsc-1 subunit mediating beta-1,3-glucan deposition. J. Biol. Chem. **275**(51): 40628–40634.

Lebendiker, M., e Danieli, T. 2014. Production of prone-to-aggregate proteins. FEBS Lett. **588**(2): 236–246.

Lévy, R., Thanh, N.T.K., Doty, R.C., *et al.* 2004. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. J. Am. Chem. Soc. **126**: 10076–10084.

Matos, O., Costa, M., Lundgren, B., *et al.* 2001. Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **20**: 573–575.

Matos, O., Costa, M.C., Correia, I., *et al.* 2006. Infecção por *Pneumocystis jirovecii* em imunocompetentes com Patologia pulmonar em Portugal. Acta Med. Port. **19**: 121–126.

Omidfar, K., Khorsand, F., e Darziani Azizi, M. 2013. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. Biosens. Bioelectron. **43**: 336–347.

Phan, H.T.M., Bartelt-Hunt, S., Rodenhause, K.B., *et al.* 2015. Investigation of bovine serum albumin (BSA) attachment onto self-assembled monolayers (SAMs) using combinatorial quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and spectroscopic ellipsometry (SE). PLoS One **10**(10).

Pottratz, S.T., Paulsrud, J., Smith, J.S., *et al.* 1991. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp120, a fibronectin binding protein. J. Clin. Invest. **88**: 403–407.

Quesada-González, D., e Merkoçi, A. 2015. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. Biosens. Bioelectron. **73**: 47–63.

Quist, J., e Hill, A.R. 1995. Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. Chest **108**(2): 415–418.

Rani, N.U., Reddy, V.V.R., Kumar, A.P., *et al.* 2000. Clinical profile of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV infected persons. Ind. J. Tub. **47**: 93 – 96.

Redhead, S.A., Cushion, M.T., Frenkel, J.K., *et al.* 2006. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and typifications. J. Eukaryot. Microbiol. **53**(1): 2–11.

Rosano, G.L., e Ceccarelli, E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. Front. Microbiol. **5**(172): 1–17.

Safrin, S., Finkelstein, D.M., Feinberg, J., *et al.* 1996. Comparison of three regimens for treatment of mild to moderate *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. A double-blind, randomized trial of oral trimethoprim-sulfamethoxazole, dapsone-trimethoprim, and clindamycin-primaquine. Ann. Intern. Med. **124**(9): 792–802.

Sepkowitz, K., Brown, A., Telzak, E., *et al.* 1992. *Pneumocystis carinii* pneumonia among patients without AIDS at a cancer hospital. JAMA **267**: 832–837.

Sigma-Aldrich. 2015. Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit. St Louis, MO

Singh, A., Upadhyay, V., e Panda, A.K. 2005. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. Insoluble Proteins Methods Protoc. **99**(4): 283–291.

Sperling, R.A., e Parak, W.J. 2010. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. Phil. Trans. R. Soc. A **368**: 1333–1383.

Stringer, J.R. 1996. *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly? Clin. Microbiol. Rev. **9**(4): 489–498.

Stringer, J.R. 2005. Surface Antigens. In *Pneumocystis Pneumonia* (P. Walzer e M. Cushion eds), 3ª ed., pp 95–126, Marcel Dekker, New York.

Stringer, J.R., Beard, C.B., Miller, R.F., *et al.* 2002. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg. Infect. Dis. **8**(9): 891–896.

Szunerits, S., Spadavecchia, J., e Boukherroub, R. 2014. Surface plasmon resonance: signal amplification using colloidal gold nanoparticles for enhanced sensitivity. Rev Anal Chem **33**(3): 153–164.

- Tasaka, S., Hasegawa, N., Kobayashi, S., *et al.* 2007. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest* **131**(4): 1173–1180. The American College of Chest Physicians.
- ThermoFisher. 2015. 1-Step NBT/BCIP Substrate Solution. Versão 20 de Julho de 2016. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/34042> in ThermoFisher, <https://www.thermofisher.com/>.
- Thobhani, S., Attree, S., Boyd, R., *et al.* 2010. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. *J. Immunol. Methods* **356**: 60–69.
- Thomas, C.F., e Limper, A.H. 2004. *Pneumocystis* Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **350**(24): 2487–2498.
- Tomás, A.L., Cardoso F., Esteves F. *et al.* (2016) Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Sci. Rep.* **6**(36287): 1-8
- Tomás, A.L.R. 2014. Novas abordagens no diagnóstico serológico da pneumocistose. Tese de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- Tsai, D.-H., Delrio, F.W., Keene, A.M., *et al.* 2011. Adsorption and Conformation of Serum Albumin Protein on Gold Nanoparticles Investigated Using Dimensional Measurements and in Situ Spectroscopic Methods. *Langmuir* **27**: 2464–2477.
- Uechi, I., e Yamada, S. 2008. Photochemical and analytical applications of gold nanoparticles and nanorods utilizing surface plasmon resonance. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**: 2411–2421.
- Upadhyay, A.K., Murmu, A., Singh, A., *et al.* 2012. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**(3).
- Vagenende, V., Yap, M.G.S., e Trout, B.L. 2009. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* **48**(46): 11084–11096.
- Wakefield, A.E. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J. Clin. Microbiol.* **34**(7): 1754–1759.
- Wakefield, A.E. 2002. *Pneumocystis carinii*. *Br. Med. Bull.* **61**: 175–188.
- Wakefield, A.E., Pixley, F.J., Banerji, S., *et al.* 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* **336**: 451–453.
- Wang, J., Wright, T.W., e Gigliotti, F. 2011. Immune modulation as adjunctive therapy for *Pneumocystis* pneumonia. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2011**: 1 – 7.
- Wickramasinghe N., Choudhary S. e Geisler E. 2007. Bionanotechnology: its applications and relevance to healthcare. *Int. J. Biomedical Engineering and Technology* **1**(1): 41-58
- Wild, D., John, R., e Sheehan, C. 2013. Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays *In The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques.* (O'Farrell B.) 4^a ed., pp 89-107, Elsevier, Oxford.
- Walker, J. Electrophoretic techniques. 2010. *In Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (K. Wilson e J. Walker eds), 7^a ed., pp. 399-432, Cambridge University Press, UK
- Xu, X., Caswell, K.K., Tucker, E., *et al.* 2007. Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1167**: 35–41.
- Yasun, E., Kang, H., Erdal, H., *et al.* 2013. Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods. *Interface Focus* **3**: 1–9.
- Zeng, S., Yong, K.-T., Roy, I., *et al.* A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics* **6**: 491–506.
- Zhang, H.M., Lou, K., Cao, J., *et al.* 2014. Interaction of a hydrophobic-functionalized pamam dendrimer with bovine serum albumin: Thermodynamic and structural changes. *Langmuir* **30**(19): 5536–5544.
- Zheng, Y., Hong, Y., Wu, W., *et al.* 2015. Separation of different shape biosynthesized gold nanoparticles via agarose gel electrophoresis. *Sep. Purif. Technol.* **151**: 1 – 20. Elsevier B.V.
- Zhong, R., Liu, Y., Zhang, P., *et al.* 2014. Discrete nanoparticle-BSA conjugates manipulated by hydrophobic interaction. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**(22): 19465–19470.

7 | ANEXOS

7.1 ANEXO I

Vetor de expressão *pLATE31* - Elementos genéticos constituintes e funções

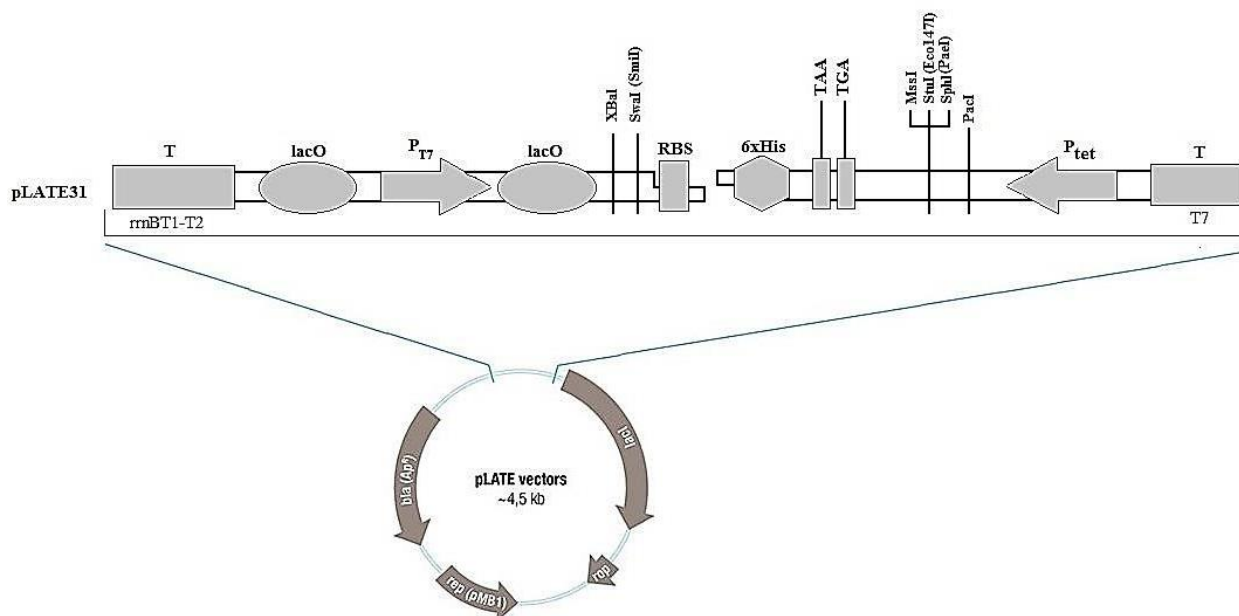


FIGURA I. 1 | Vetor de expressão *pLATE31*. Adaptado de Tomás, 2014.

TABELA I. 1 | Elementos genéticos constituintes do vetor de expressão *pLATE31* e funções.

Constituinte	Função
bla (Ap ^r)	Gene da β-lactamase que confere resistência à ampicilina, sendo útil na seleção e manutenção de colônias transformadas em cultura.
TrnBT1-T2	Terminador da transcrição que previne a expressão basal do gene.
<i>LacO</i>	Operão lac que controla a expressão genética.
P _{T7}	Promotor da RNA polimerase T7 que dirige a transcrição do gene clonado.
RBS	Local de ligação do ribossoma para uma tradução efetiva do gene clonado.
6xHis	Cauda C-terminal de histidinas
P _{tet}	Promotor P _{tet} que reduz a expressão basal a partir do promotor T7.
T _{T7}	Terminador da transcrição a partir do promotor T7.
<i>LacI</i>	Repressor <i>lac</i> que efetua o controle da expressão basal através do promotor P _{T7} .
<i>rop</i>	Proteína que regula o número de cópias do plasmídeo.
<i>rep (pMB1)</i>	Origem de replicação (<i>rep</i>) do plasmídeo pMB1

TABELA I. 2 | Composição do antígeno recombinante sintético multiepitopo. Adaptado de Tomás, 2014.

Sequência de aminoácidos do antígeno rsm	GTTEILKQVLLNEHKDTLKDQESCVKYLKEKCNKWSRRGNDRFSLVCVFLEG GGGGVAEVFGRYVGLKERCNKLESDCGIKEDCKDLEGVCGKIQGGGGGTST ITSKITLTSTRCKPTKCTTGDDAEDVKPSEGLKMSGWSVMRGHHHHHH
--	---

7.2 ANEXO II

Otimização da purificação de antígeno rsm por IMAC

Para a otimização da purificação do antígeno rsm, foi efetuado o mesmo protocolo em cada ensaio, com ligeiras alterações, e utilizada uma coluna de cromatografia *HiTrap* de 1mL (*GE Healthcare Life Sciences*) empacotada com 1mL de resina *Sepharose 6 FastFlow* (*GE Healthcare Life Sciences*) com iões Cu^{2+} imobilizados [Sulfato de cobre penta-hidratado 0,1M; *Merck*].

■ 1º Ensaio – Comparação entre 8 tampões

Para o primeiro ensaio de purificação, purificou-se oito amostras de 2mL. O presente ensaio teve como intuito o estudo de oito tampões diferentes na purificação do antígeno, efetuando-se o mesmo protocolo para cada um.

TABELA I. 3 | Tampões de lavagem e ligação estudados.

1) Fosfato de sódio [500mM NaCl; 20mM Na_2HPO_4 ; 20mM Imidazole; pH 7,4]
2) MES [500mM NaCl; 20mM MES (99%, <i>Sigma-Aldrich</i>); 20mM Imidazole; pH 6,0]
3) MES [500mM NaCl; 20mM MES; 20mM Imidazole; pH 6,5]
4) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES (99%, <i>Sigma-Aldrich</i>); 20 mM Imidazole; pH 7,5]
5) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 20mM Imidazole; pH 8,0]
6) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base (99%, <i>AppliChem</i>); 20mM Imidazole; pH 8,0]
7) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 20mM Imidazole; pH 8,5]
8) Bicarbonato de sódio [500mM NaCl; 20mM NaHCO_3 (99%, <i>Sigma-Aldrich</i>); 20mM Imidazole; pH 8,5]

Primeiramente, aplicou-se 10mL de tampão de ligação, seguidos de 2mL de amostra [sedimento ressuspensionado em ureia e tampão de ligação; 1:3], aplicados lentamente para garantir que o antígeno com cauda de histidina se liga aos iões cobre imobilizados, repetindo-se o procedimento duas vezes. De seguida, aplicou-se 10mL de tampão de ligação, e, por fim, 20mL de tampão de eluição.

TABELA I. 4 | Tampões de eluição estudados.

1) Fosfato de sódio [500mM NaCl; 20mM Na_2HPO_4 ; 500mM Imidazole; pH 7,4]
2) MES [500mM NaCl; 20mM MES; 500mM Imidazole; pH 6,0]
3) MES [500mM NaCl; 20mM MES; 500mM Imidazole; pH 6,5]
4) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 500mM Imidazole; pH 7,5]
5) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 500mM Imidazole; pH 8,0]
6) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 500mM Imidazole; pH 8,0]
7) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 500mM Imidazole; pH 8,5]
8) Bicarbonato de sódio [500mM NaCl; 20mM NaHCO_3 ; 500mM Imidazole; pH 8,5]

Após a fase de aplicação do tampão de eluição, a coluna foi lavada com 5mL de tampão de remoção de cobre [20mM Na_2HPO_4 ; 500mM NaCl; 50mM EDTA; pH 7,4], e de seguida, com 10mL de água *Milli-Q*, 5mL de NaOH 0,1 M, pH 12 e 15mL de água *Milli-Q*. No final, adicionou-se 3mL de 0,1M Sulfato de cobre penta-hidratado, colocando-se a 4°C durante 30min, e antes de nova utilização, a coluna é lavada com 20mL de água *Milli-Q*. Este passo de remoção e lavagem de coluna foi efetuado

entre todos os ensaios de purificação, tornando a coluna apta para uma nova purificação. O volume eluído durante a purificação foi recolhido em frações de 1mL e armazenado a 4°C. Por ELISA indireta foi possível confirmar a presença do antígeno rsm, enquanto que por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível confirmar a pureza da proteína em estudo.

■ 2º Ensaio – Presença e ausência de glicerol

Neste ensaio, estudou-se o efeito do glicerol na purificação do antígeno rsm. O glicerol atua como co-solvente estabilizador de proteínas em soluções aquosas, por isso foi testado o efeito da sua presença em quatro tampões de eluição diferentes, em comparação com a ausência de glicerol nos mesmos quatro tampões de eluição, mantendo os tampões de lavagem e ligação constantes. Para tal, sujeitou-se oito amostras ao ensaio de purificação. Para o presente ensaio, estudou-se o efeito de oito tampões diferentes na purificação do antígeno rsm, efetuando-se o mesmo protocolo para cada um dos tampões. Aplicou-se 10mL de tampão de lavagem e de seguida, aplicou-se a 2mL de amostra, repetindo-se o procedimento duas vezes. Posteriormente, aplicou-se 10mL de tampão de ligação e 20mL de tampão de eluição. A combinação de tampões encontra-se na **TABELA I. 5**.

TABELA I. 5 | Combinação de tampões de lavagem, ligação e eluição utilizada no 2º ensaio.

Tampão de lavagem e ligação	Tampão de eluição
1) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 20mM Imidazole; pH 7,5]	A) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 500mM Imidazole; 5% glicerol; pH 7,5] B) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 500mM Imidazole; pH 7,5]
2) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 20mM Imidazole; pH 8,0]	C) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 500mM Imidazole; 5% glicerol; pH 8,0] D) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 500mM Imidazole; pH 8,0]
3) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 20mM Imidazole; pH 8,0]	E) Tris-HCl [500 mM NaCl; 20 mM Tris base; 500 mM Imidazole; 5% glicerol; pH 8,0] F) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris base; 500mM Imidazole; pH 8,0]
4) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 20mM Imidazole; pH 8,5]	G) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 500mM Imidazole; 5% glicerol; pH 8,5] H) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 500mM Imidazole; pH 8,5]

Após a fase de aplicação do tampão de eluição, foi efetuado o protocolo de remoção do cobre e preparação para novos ensaios. O volume eluído durante a purificação foi recolhido em frações de 1mL e armazenado a 4°C. Por ELISA indireta foi possível confirmar a presença do antígeno rsm nas frações eluídas com tampão de eluição e a ausência do mesmo nas restantes frações e por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível confirmar a pureza da proteína em estudo.

■ 3º e 4º ensaios – Alteração do tampão de lavagem e ligação

Os seguintes ensaios tiveram como intuito o estudo de diferentes tampões de ligação, permitindo compreender que combinação de tampões permitiria um aumento da capacidade de ligação da proteína à resina bem como a eliminação da maior quantidade de proteínas contaminantes. Foram testados três tampões de lavagem e ligação e dois tampões de eluição diferentes. Para tal, sujeitou-

se seis amostras ao ensaio de purificação. O processo de purificação foi efetuado como no ensaio anterior. A combinação de tampões testada encontra-se na **TABELA I. 6**.

TABELA I. 6 | Combinação de tampão estudados no 3º e 4º ensaios.

Tampão de lavagem e ligação	Tampão de eluição
1) Fosfato de sódio [500mM NaCl; 20mM Na ₂ HPO ₄ ; 20mM Imidazole; pH 7,4]	A) Tris-HCl [500mM NaCl;
2) Bicarbonato de sódio [500mM NaCl; 20mM NaHCO ₃ ; 20mM Imidazole; pH 8,5]	20mM Tris-base; 500mM
3) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 20 mM Imidazole; pH 8,0]	Imidazole; pH 8,0]
1) Fosfato de sódio [500mM NaCl; 20mM Na ₂ HPO ₄ ; 20mM Imidazole; pH 7,4]	B) HEPES [500mM NaCl;
2) Bicarbonato de sódio [500mM NaCl; 20mM NaHCO ₃ ; 20mM Imidazole; pH 8,5]	20mM HEPES; 500mM
3) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 20mM Imidazole; pH 7,5]	Imidazole; pH 7,5

Após a fase de eluição da proteína em estudo, efetuou-se o passo de remoção de cobre e lavagem da coluna, conforme exposto nos ensaios anteriores. O volume eluído durante a purificação foi recolhido em frações de 1mL e armazenado a 4°C. Por ELISA indireta foi possível confirmar a presença do antígeno rsm nas frações eluídas com tampão de eluição e por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível confirmar a pureza da proteína em estudo.

■ 5º ensaio – HEPES pH 7,5 / Tris-HCl pH 8,0

Após se ter chegado à conclusão de quais os dois melhores tampões em estudo, efetuou-se o seguinte ensaio para uma comparação do antígeno purificado final obtido através da purificação com cada um dos tampões. Para tal, sujeitou-se duas amostras de 2mL ao ensaio de purificação. Para o presente ensaio, efetuou-se o mesmo protocolo para cada um dos tampões. Aplicou-se 10mL de tampão de lavagem, correspondente a cada tampão:

- | |
|---|
| 1) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 20mM Imidazole; pH 7,5] |
| 2) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 20mM Imidazole; pH 8,0] |

De seguida, aplicou-se a 2mL de amostra, repetindo-se o procedimento duas vezes. De seguida, aplicou-se 10mL de tampão de ligação – tampão igual ao da lavagem – e, por fim, 20mL de tampão de eluição, correspondente a cada tampão:

- | |
|--|
| 1) HEPES [500mM NaCl; 20mM HEPES; 500mM Imidazole; pH 7,5] |
| 2) Tris-HCl [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 500mM Imidazole; pH 8,0] |

Após a fase de eluição da proteína em estudo, efetuou-se o passo de remoção de cobre e lavagem da coluna, conforme exposto nos ensaios anteriores. O volume eluído durante a purificação foi recolhido em frações de 1mL e armazenado a 4°C. Por ELISA indireta foi possível confirmar a presença do antígeno rsm nas frações eluídas com tampão de eluição, enquanto que por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível confirmar a pureza da proteína em estudo.

■ 6º ensaio – Purificação final do antígeno rsm para bionanoconjugação

Para a futura conjugação com as nanopartículas de ouro (AuNP), purificou-se dez amostras: seis de 6mL e quatro de 2mL, com o tampão Tris-HCl pH 8,0 como tampão de lavagem, ligação e eluição. Aplicou-se 10mL de tampão de lavagem Tris-HCl pH 8,0 [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 20mM Imidazole; pH 8,0]. De seguida, aplicou-se 2mL de amostra, repetindo-se o procedimento duas vezes, lavou-se novamente a coluna com 10mL de tampão de ligação Tris-HCl pH 8,0 [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 20mM Imidazole; pH 8,0] e, por fim, 20mL de tampão de eluição Tris-HCl pH 8,0 [500mM NaCl; 20mM Tris-base; 500mM Imidazole; pH 8,0]. Para cada purificação juntou-se as frações que apresentavam maior valor de absorvância por ELISA indireta - indicativo de maior concentração de antígeno - em *falcons* de 15mL, sendo de seguida armazenados a 4°C. Parte do volume de proteína purificada obtida foi dialisada com o intuito de remover a concentração elevada de imidazole e de NaCl, possíveis interferentes na bionanoconjugação com AuNP, através de uma fita de diálise com porosidade 12,400 MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*, D-0655, *Sigma*), contra o tampão Tris-HCl pH 8,0 [10mM Tris-base; 20mM NaCl; 2% glicerol; pH 8,0]. Para determinar a concentração de antígeno rsm presente em cada volume purificado armazenado, recorreu-se ao método do Ácido Bicinconínico (BCA) e por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 15% foi possível avaliar a sua pureza.

7.3 ANEXO III

Marcador de pesos moleculares

TABELA I. 7 | Constituição do marcador de pesos moleculares *(made in house)*. *Mw* (do inglês, *Molecular weight*)

Componentes presentes do Marcador	<i>Mw</i>
Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine serum albumin</i> ; <i>Sigma</i>)	66,6 kDa
Ovalbumina de galinha (do inglês, <i>Ovalbumin from egg white</i> ; <i>Sigma</i>)	45 kDa
Anidrase carbónica (do inglês, <i>Carbonic anhydrase from bovine erythrocytes</i> ; <i>Sigma</i>)	30 kDa
Tripsinogénio (do inglês, <i>Trypsinogen</i> ; <i>Sigma</i>)	23,9 kDa
RNAse A (<i>Roth</i>)	13,7 kDa

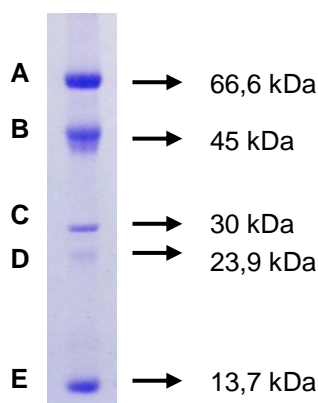


FIGURA I. 2 | Marcador de pesos moleculares composto por **A.** Albumina (*Sigma*); **B.** Ovalbumina (*Sigma*); **C.** Anidrase carbónica (*Sigma*); **D.** Tripsinogénio (*Sigma*); **E.** RNAse A (*Roth*)

7.4 ANEXO IV

Eletroforese de proteínas SDS-PAGE

Para a realização de uma eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE 15%, procedeu-se à preparação de uma solução de separação (resolução) e de uma solução de *stacking* (concentração). Na presente dissertação, o gel de separação foi preparado com o intuito de se obter um gel com 15% em acrilamida e o gel de *stacking* com o intuito de se obter um gel com 6% de acrilamida. Os respectivos reagentes encontram-se descritos na **TABELA I. 8**.

TABELA I. 8 | Composição das soluções de separação e *stacking* que compõem o gel de SDS-PAGE a 15%.

Reagentes	Gel de separação (Acrilamida a 15%)	Gel de <i>stacking</i> (Acrilamida a 6%)
Água desionizada <i>Milli-Q</i>	3,5 mL	3,1 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25 mL
40% Acrilamida/Bis	3,72 mL	0,75 mL
10% SDS	0,1 mL	0,1 mL
10% Persulfato de amônia	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,01 mL	0,01 mL

A eletroforese em gel de SDS-PAGE (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) é uma técnica utilizada na análise qualitativa de volumes complexos de proteína e que se fundamenta pela separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular, permitindo, uma determinação relativa do tamanho das proteínas em estudo. O gel de SDS-PAGE contém na sua constituição acrilamida/bis, sendo formado pela polimerização dos monómeros de acrilamida na presença de bisacrilamida. O processo de polimerização é iniciado após a adição da solução de persulfato de amônia e estabilizado pelo reagente TEMED (tetra-metil-etilenodiamina). Findo o processo de polimerização, as amostras são previamente fervidas durante um curto tempo em tampão de amostra. Este tampão contém na sua constituição β -mercaptoetanol - reduz as pontes de dissulfureto (S-S) que permitem o estabelecimento da estrutura terciária das proteínas – e SDS – detergente aniônico que desnatura as proteínas e confere uma densidade uniforme, possibilitando a separação unicamente dependente da massa –, originando proteínas com estrutura linear e carga negativa. Após a aplicação das amostras e na presença de uma corrente elétrica, estas migram em direção ao polo positivo, sendo separadas de acordo com o seu tamanho (peso molecular).

O gel de SDS-PAGE é constituído por dois géis diferentes: gel de separação/resolução – inferior - e o gel de *stacking*/concentração – superior. O gel de *stacking* permite que as proteínas sejam concentradas numa única linha, possibilitando a passagem para o gel de separação ao mesmo tempo e a comparação das mobilidades. A distância de migração de cada proteína é controlada pela percentagem de acrilamida presente em cada gel. Desta forma, quanto menor o tamanho da proteína, maior a sua facilidade em atravessar os poros formados pela acrilamida, variando estes com a concentração de acrilamida/bisacrilamida presente em cada gel. (Wilson e Walker, 2010)

7.5 ANEXO V

Método do Ácido Bicinconínico (*Bicinchoninic Acid Assay*)

O método do ácido bicinconínico, referido na secção 2.2.4 dos materiais e métodos, é frequentemente utilizado para determinar a concentração proteica. Na presença de proteínas e em combinação com iões Cu(II), o ácido bincinconínico (BCA) desencadeia uma mudança de cor de verde para roxo. Esta mudança de cor resulta da redução de Cu(II) a Cu(I) devido à presença de ligações peptídicas levando à formação de complexos de Cu(I) com BCA que absorvem fortemente a 562nm. Este método permite detetar até 0,5µg/mL de proteína. Após incubação das amostras de interesse durante 30min a 37°C, mediu-se, com recurso a um espectrofotómetro (*Varian Cary*, modelo 50 versão 3.0), os volumes crescentes de BSA, com o intuito de construir as retas de calibração, e assim determinar a concentração da proteína em estudo.

TABELA I. 9 | Concentração de proteína em estudo, proveniente do último ensaio de purificação efetuada.

Purificação	Concentração (mg/mL)	Média das concentrações	Volume (µL)
1	1,181366086	1,02714324	10
	0,872920394		
2	0,71939075	0,846168757	
	0,972946763		
3	0,459203452	0,480408237	
	0,501613021		
4	0,526634634	0,523189694	
	0,519744754		
5	0,813355506	0,859192849	
	0,905030191		
6	1,278051734	1,416823626	
	1,555595517		
7	0,960093975	0,877512783	
	0,794931591		
8	1,284208417	1,273336351	
	1,262464285		
9	1,126819611	1,168369413	
	1,209919214		
10	0,815242291	0,788485915	
	0,761729538		

TABELA I. 10 | Concentração do antígeno rsm, após diálises, e do soro policlonal anti-arsm.

	Concentração (mg/mL)	Média das concentrações	Volume (µL)
Diálise 1	6,531432629	6,092928648	10
	5,654424667		
Diálise 2	10,08778286	8,578917265	
	7,07005167		
Soro	18,41	Fator de diluição x5 = 96,35621263	
	20,33		

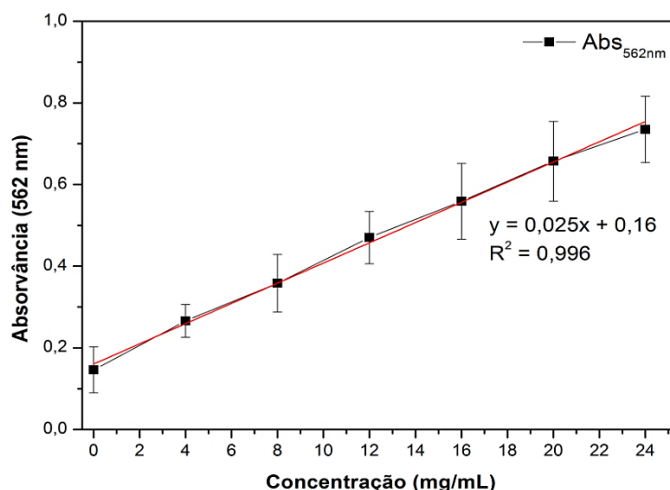


FIGURA I. 3 | Reta de calibração. Desvio padrão representativo de quadruplicados.

7.6 ANEXO VI

Tampões e concentrações de EDC/NHS testadas

TABELA I. 11 | Bionanoconjugados com EDC/NHS. Tampões e concentrações testadas para a sua formação.

Tampões	Concentrações de EDC/NHS testadas
MES	1. 0,2mM EDC/0,2mM NHS
10mM pH 7	2. 0,8mM EDC/0,8mM NHS
[10mM C ₆ H ₁₃ NO ₄ S; pH 7]	3. 1mM EDC/1mM NHS
	4. 2mM EDC/2mM NHS
PBS 1x	1. 0,2mM EDC/0,8mM NHS
pH 7,4	2. 0,4mM EDC/1mM NHS
[137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4]	3. 1mM EDC/3mM NHS
	4. 2mM EDC/5mM NHS
Água Milli-Q	1. 0,2mM EDC/0,2mM NHS
	2. 0,4mM EDC/0,4mM NHS
	3. 0,8mM EDC/0,8mM NHS
	4. 1mM EDC/1mM NHS
Fosfato de sódio (PB)	
5mM pH 7,2	1. 0,1mM EDC/0,2mM NHS
[5mM; Fosfato de sódio monobásico dihidratado (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O) e Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄) 1:1; pH 7,2]	2. 0,2mM EDC/0,4mM NHS
	3. 0,4mM EDC/0,8mM NHS
	4. 0,5mM EDC/1mM NHS

7.7 ANEXO VII

3º e 4º ensaio de purificação: Resultados

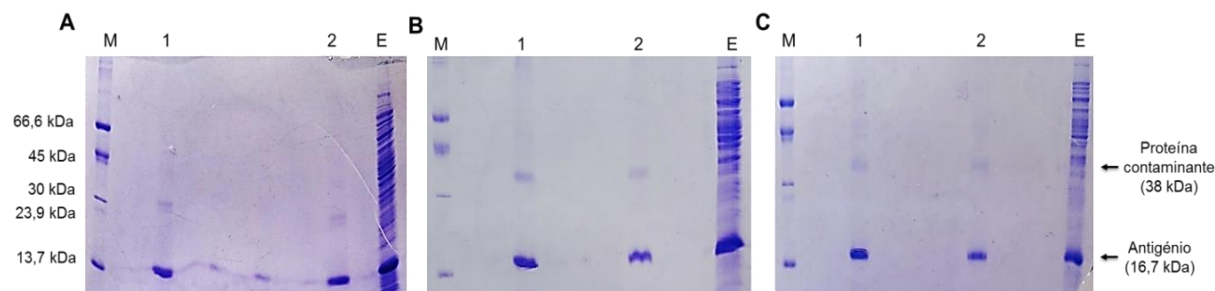


FIGURA I. 4 | Gel em SDS-PAGE a 15%. A. Tris-HCl pH 8,0 (M. Marcador de peso molecular; Lavagem e ligação com: 1. Fosfato de sódio pH 7,4; 2. Bicarbonato de sódio pH 8,5; E. extrato); **B.** HEPES pH 7,5 (M. Marcador de peso molecular; Lavagem e ligação com: 1. Fosfato de sódio pH 7,4; 2. Bicarbonato de sódio pH 8,5; E. extrato); **C.** HEPES pH 7,5/Tris-HCl pH 8,0 (M. Marcador de peso molecular; 1. HEPES pH 7,5; 2. Tris-HCl pH 8,0; E. extrato).

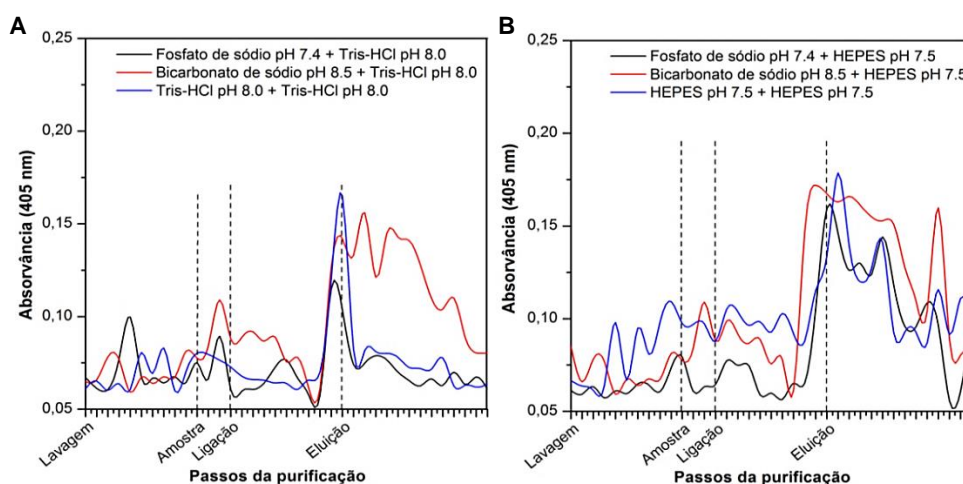


FIGURA I. 5 | Purificação por IMAC. A. Tris-HCl pH 8,0 ou **B.** HEPES pH 7,5. Representação dos resultados obtidos por ELISA indireta e resultante da análise dos produtos da purificação por IMAC.

7.8 ANEXO VIII

6º Ensaio de purificação: Resultados

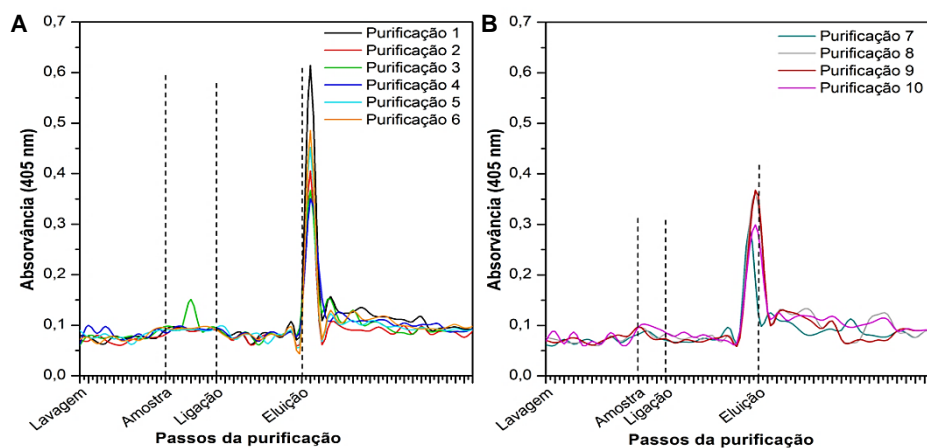


FIGURA I. 6 | Purificação por IMAC: Antígeno rsm para conjugação com AuNP. Resultados obtidos por ELISA indireta **A.** Utilização de 6mL de amostra; **B.** 2mL de amostra

7.9 ANEXO IX

Western-Blot

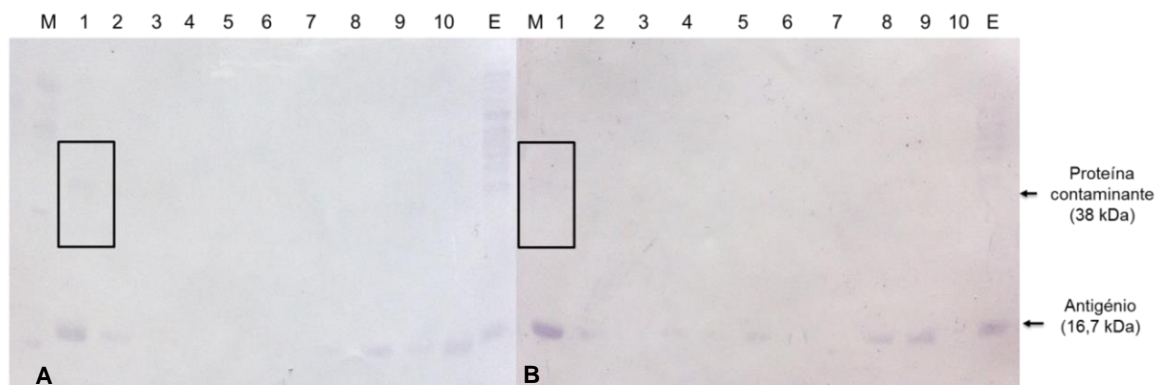


FIGURA I. 7 | Western-Blot: Resultados provenientes da aplicação do: **A.** Primeiro protocolo; **B.** Segundo protocolo. Representação de antígeno rsm com 16,7kDa e proteína contaminante com 38kDa.

7.10 ANEXO X

Resultados dos ensaios com EDC/NHS

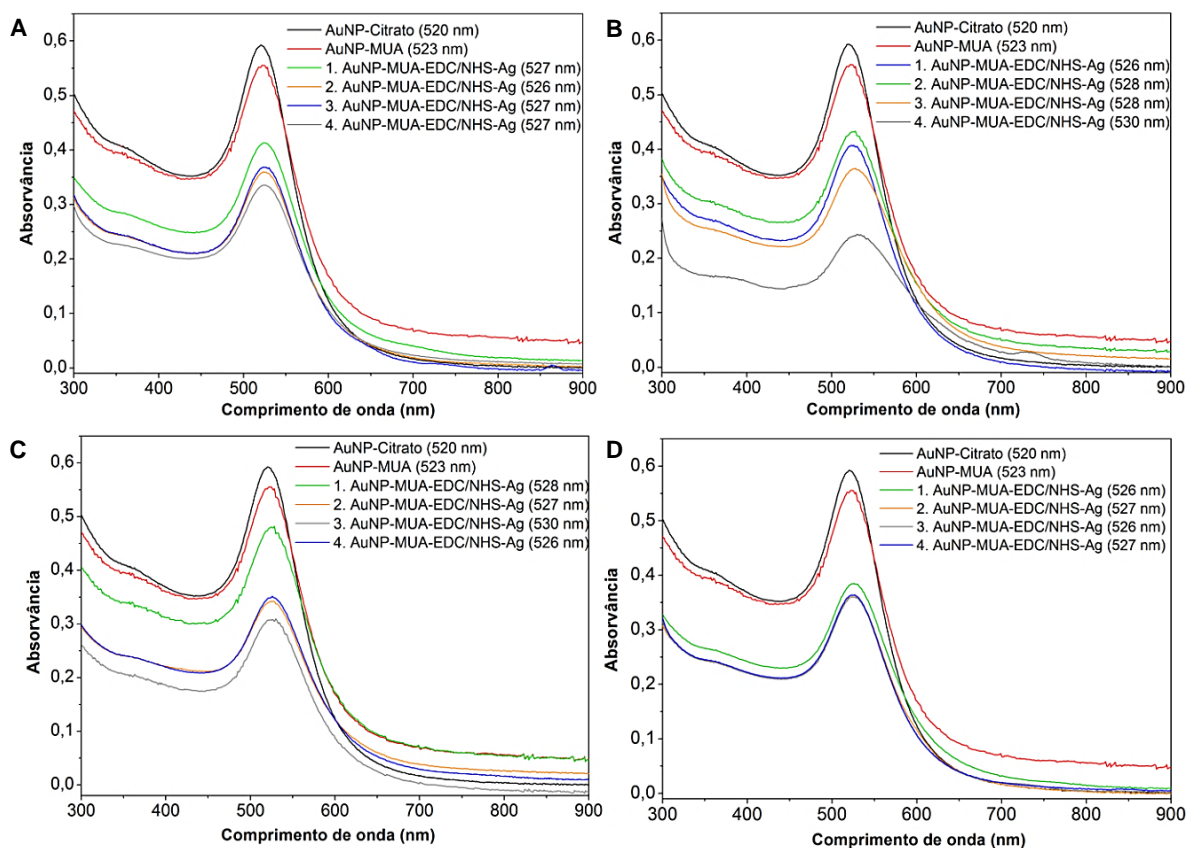


FIGURA I. 8 | Espectroscopia de UV-Vis: Espectros obtidos com indicação da absorvância máxima de SPR. **A. Tampão MES** [1. 0,2mM EDC/0,2mM NHS; 2. 0,8mM EDC/0,8mM NHS; 3. 1mM EDC/1mM NHS; 4. 2mM EDC/2mM NHS]; **B. Tampão PBS** [1. 0,2mM EDC/0,8mM NHS; 2. 0,4mMEDC/1mM NHS; 3. 1mM EDC/3mM NHS; 4. 2mM EDC/5mM NHS]; **C. Água Milli-Q** [1. 0,2mM EDC/0,2mM NHS; 2. 0,4mM EDC/0,4mM NHS; 3. 0,8mM EDC/0,8mM NHS; 4. 1mM EDC/1mM NHS]; **D. Tampão Fosfato de sódio (PB)** [1. 0,1mM EDC/0,2mM NHS; 2. 0,2mM EDC/0,4mM NHS; 3. 0,4mM EDC/0,8mM NHS; 4. 0,5mM EDC/1mM NHS].

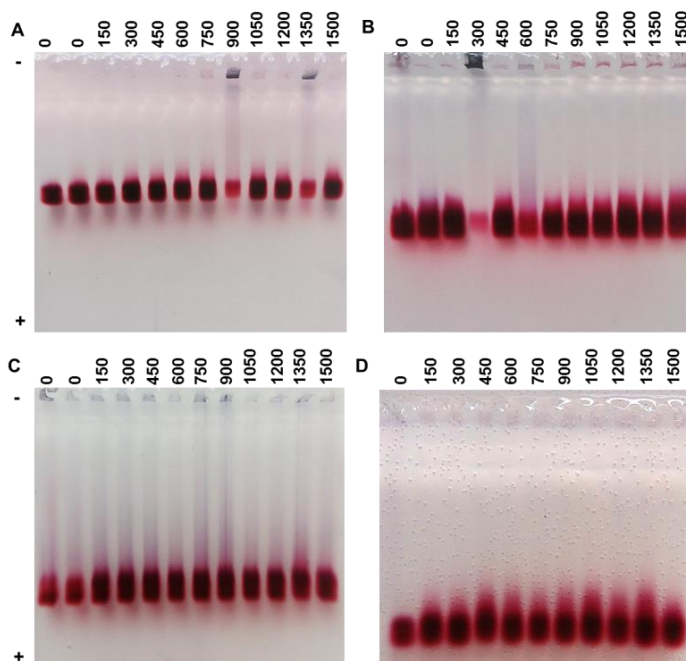


FIGURA I. 9 | Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigênio rsm, testados com razões molares de antígeno desde 0 a 1500 e diferentes tampões, tais como: **A. Água Milli-Q** [0,2mM EDC/0,2mM NHS]; **B. Tampão PBS** [0,2mM EDC/0,8mM NHS]; **C. Tampão PB** [0,4mM EDC/0,8mM NHS]; **D. Tampão MES** [1mM EDC/1mM NHS]. Ânodo (-)/Cátodo (+)

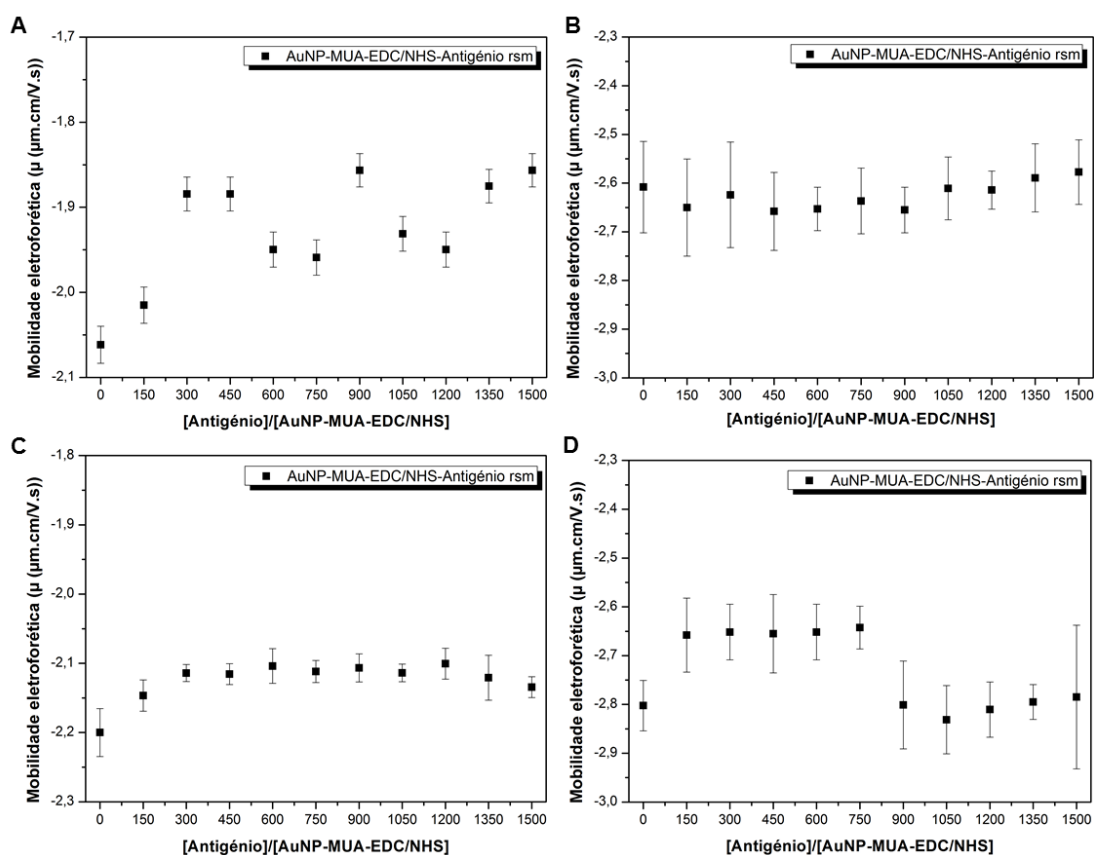


FIGURA I. 10 | Mobilidade eletroforética (μ) de bionanoconjugados AuNP-MUA-EDC/NHS-Antigênio, avaliada através da aplicação eReuss. Desvio padrão representativo de triplicados. Bionanoconjugados com EDC/NHS: **A. Água Milli-Q** [0,2mM EDC/0,2mM NHS]; **B. Tampão PBS** [0,2mM EDC/0,8mM NHS]; **C. Tampão PB** [0,4mM EDC/0,8mM NHS]; **D. Tampão MES** [1mM EDC/1mM NHS].

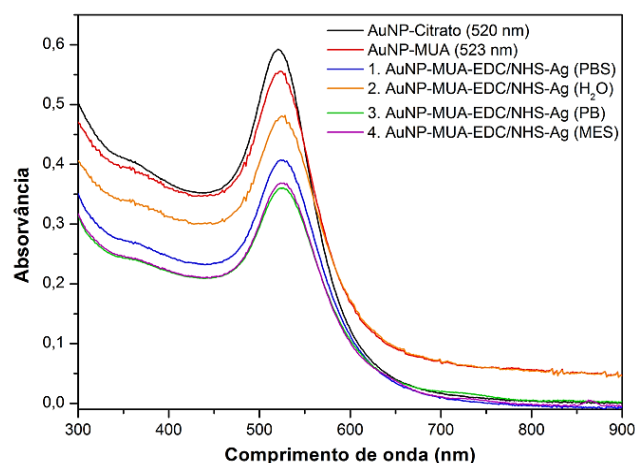


FIGURA I. 11 | Espectroscopia de UV-Vis: Espectros obtidos para AuNP-Citrato; AuNP-MUA (1:5000) e bionanoconjugados com EDC/NHS em diferentes tampões (Índice de agregação; Pico da banda de SPR): 1. PBS (0,26; 526 nm); 2. Água Milli-Q (0,30; 528 nm); 3. PB (0,28; 526 nm); 4. MES (0,29; 527 nm).

7.11 ANEXO XI

Resultado dos ensaios com bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antigénio

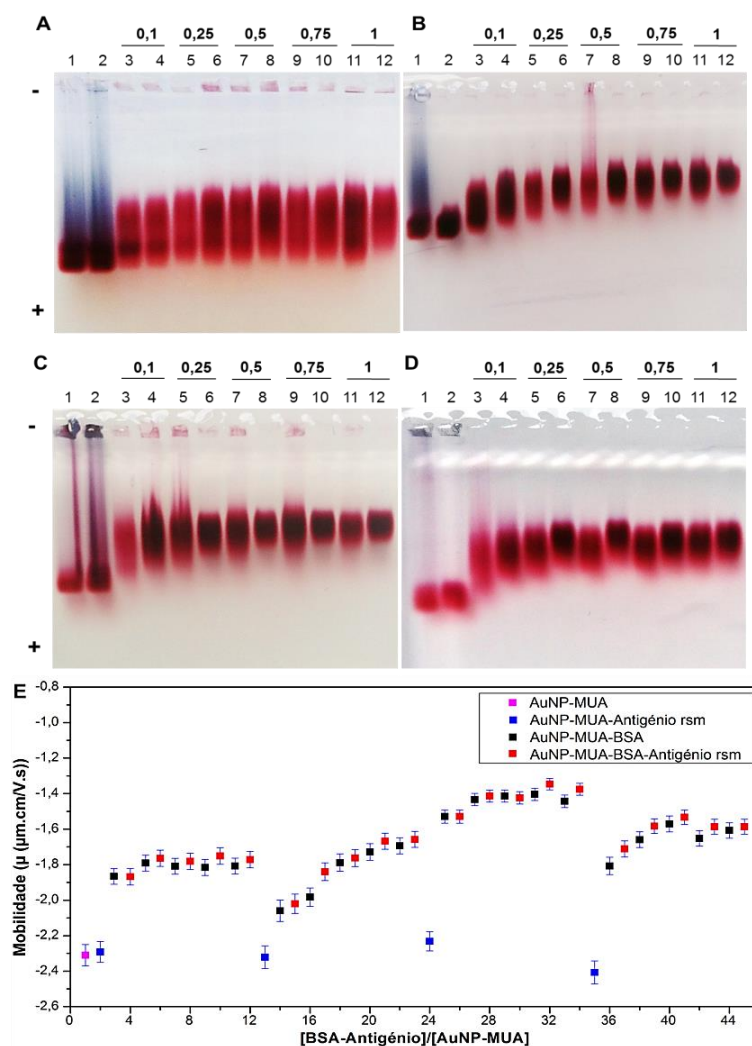


FIGURA I. 12 | Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Migrações dos bionanoconjugados compostos por razões molares BSA por antigénio de 0 a 1. Razões molares de antigénio por AuNP: **A.** 150; **B.** 300; **C.** 450; **D.** 600. Ânodo (-)/Cátodo (+). **E. Mobilidade eletroforética (μ).** Desvio padrão representativo de triplicados.

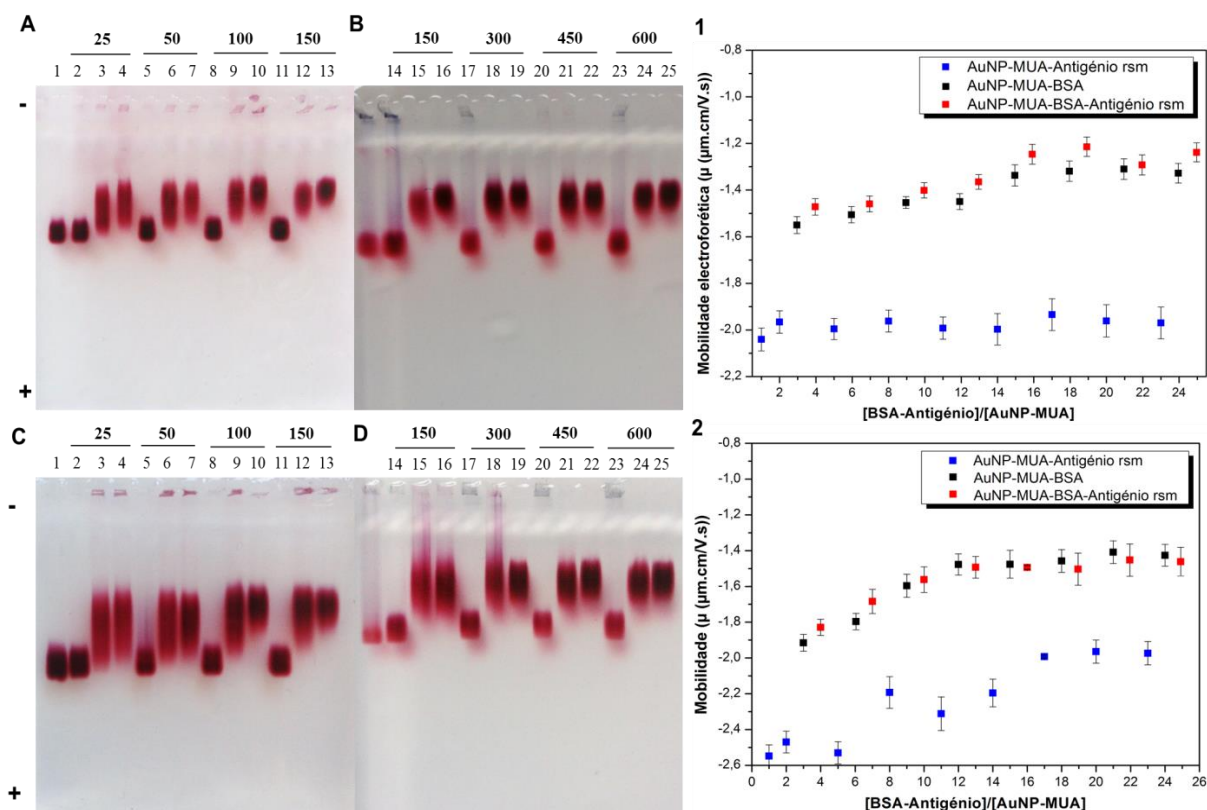


FIGURA I. 13 | Eletroforese em gel de agarose a 0,3%. Bionanoconjugados compostos por razões molares BSA/Antígeno (0,75; 1) e razões molares Antígeno/AuNP de 25 a 600. A/B. BSA por antígeno a 0.75. C/D. BSA por antígeno a 1. Ânodo (-)/Cátodo (+) Mobilidade eletroforética (μ) dos bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antígeno: Desvio padrão representativo de triplicados. Bionanoconjugados com: 1. BSA/Antígeno a 0,75; 2. BSA/Antígeno a 1.

7.12 ANEXO XII

Resultado de ensaios com soro policlonal

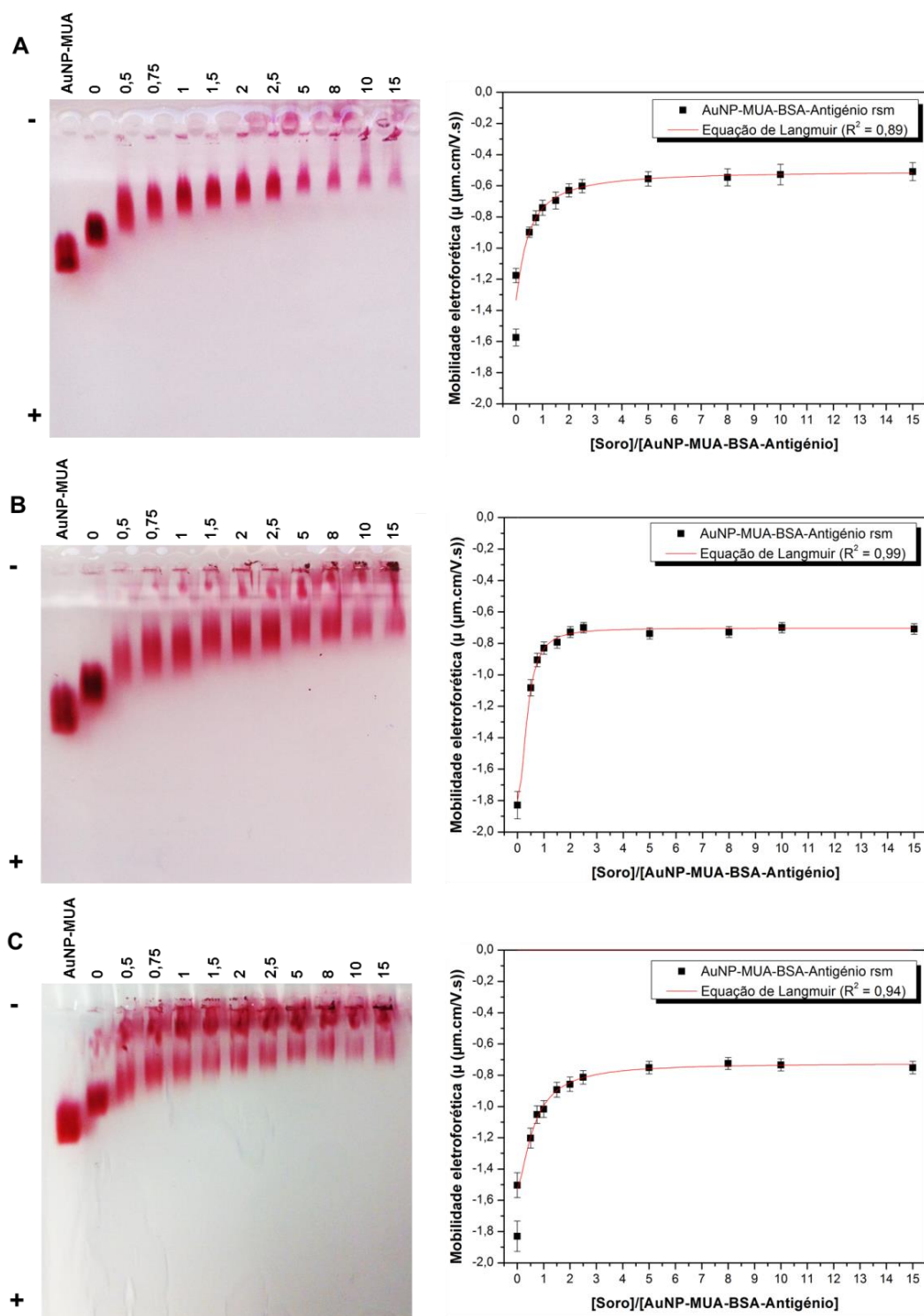


FIGURA I. 14 | Eletroforese em gel de agarose a 0,3% e mobilidade eletroforética (μ) de AuNP-MUA-BSA-Antígeno-Soro. Ligação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-BSA-Antígeno (compostos pela razões molares 1:300:225 (AuNP:Antígeno:BSA)) a anticorpos anti-arsm após diferentes tempos de incubação: **A.** 1h a 4°C; **B.** 2h a 4°C; **C.** o/n a 4°C; e diferentes razões molares [soro]/[AuNP-MUA-BSA-Antígeno] de 0 a 15. Ânodo (-)/Cátodo (+). Representação da equação de *Langmuir* e desvios padrões representativos de triplicados.

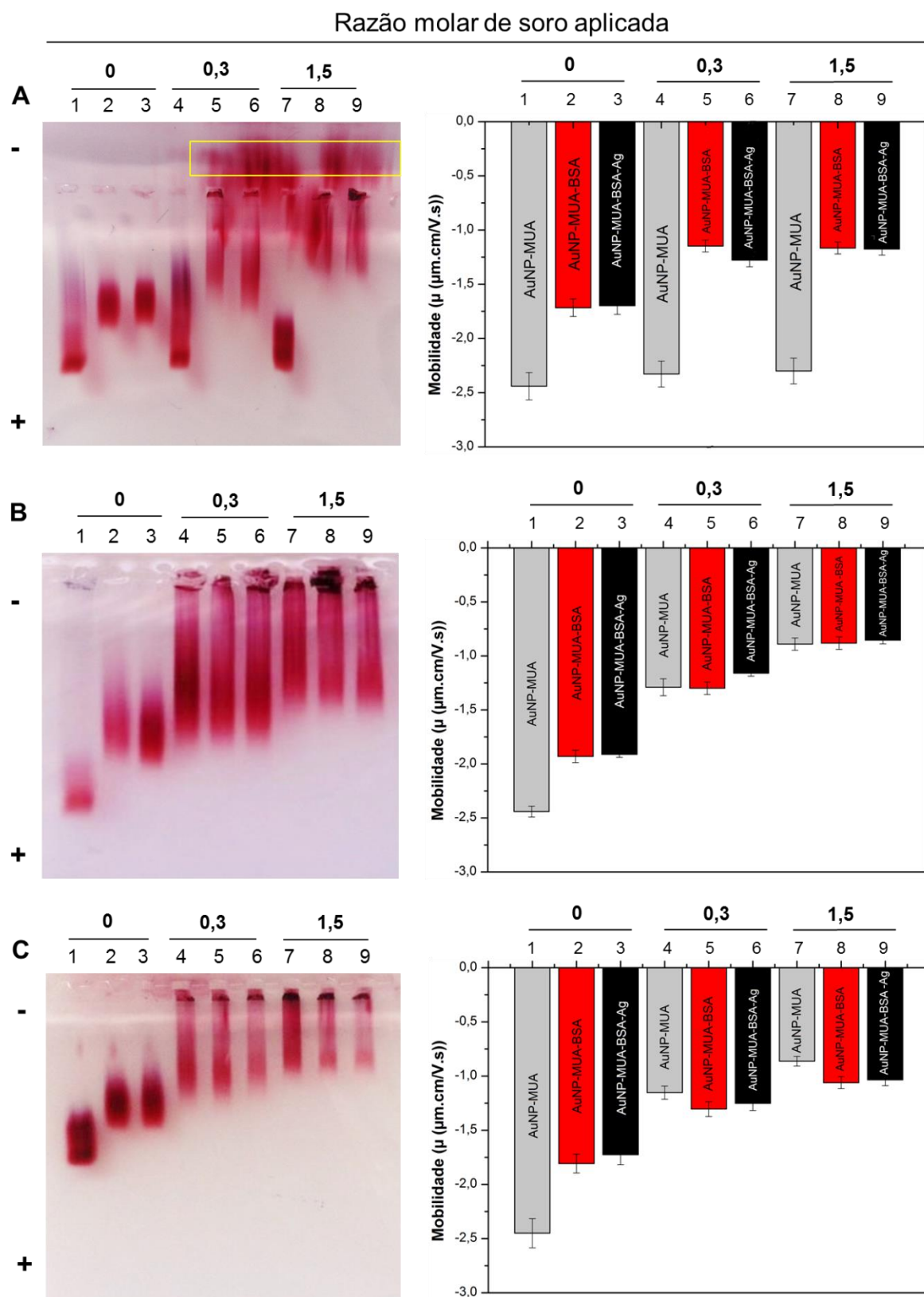


FIGURA I. 15 | Eletroforese em gel de agarose a 0,3% e mobilidade eletroforética (μ). Ligação de AuNP-MUA-BSA-Antigénio [razão molar 1:225:300] a anticorpos anti-arsm, com razões molares de [soro]/[Antigénio] de 0 a 1,5: AuNP-MUA (cinzento); AuNP-MUA-BSA (vermelho); AuNP-MUA-BSA-Antigénio (preto) **A.** Sem lavagem; **B.** 1 lavagem; **C.** 2 lavagens. Ânodo (-)/Cátodo (+). Desvio padrão representativo de triplicados.